

Aus dem Hygiene-Institut der  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
(Direktor: Professor Dr. H. Kliewe)

---

*Über die antibakterielle und antivirologische  
Wirkung von Nisin, einem antibakteriellen Stoff-  
wechselprodukt von Streptococcus lactis*

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde der  
Hohen Medizinischen  
Fakultät der  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Hans-Martin Bauer**

aus Berlin-Dahlem

1958







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
(Direktor: Professor Dr.H. Kliewe)

---

Über die antibakterielle und antivirologische  
Wirkung von Nisin, einem antibakteriellen Stoff-  
wechselprodukt von Streptococcus lactis

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Hohen Medizinischen Fakultät  
der  
Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

vorgelegt von  
Hans-Martin B a u e r  
aus Berlin-Dahlem

1 9 5 8

Dekan: Prof. Dr. Lossen

1. Referent: Prof. Dr. Kliewe

2. Referent: Dr. med. S. Carlson

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1958

Datum des Diploms 18. JUNI 1958



Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

| <u>I. Teil</u>                                                                                        | <u>Seite</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1. Einleitung und geschichtlicher Überblick                                                           | 1            |
| 2. Gewinnung und Wachstum von nisinbildenden<br>Milchsäurestreptokokken und die Nisinprä-<br>paration | 3            |
| 3. Chemische Untersuchung des Nisins                                                                  | 8            |
| 4. Physikalische Eigenschaften des Nisins                                                             | 13           |
| 5. Definition der Nisin-Einheit                                                                       | 15           |
| 6. Nachweismethoden des Nisins in vitro                                                               | 15           |
| 7. Eigenschaften des Nisins in vitro                                                                  | 20           |
| 8. Eigenschaften des Nisins in vivo                                                                   | 24           |
| 9. Wirkung des Nisins auf Infektionen                                                                 | 27           |
| 10. Anwendung des Nisins                                                                              | 32           |
| <br><u>II. Teil</u>                                                                                   |              |
| <u>Eigene Untersuchungen</u>                                                                          |              |
| 11. Diffusionstest                                                                                    | 37           |
| 12. Verdünnungstest                                                                                   | 41           |
| 13. WARBURG-Versuche                                                                                  | 45           |
| 14. Abnahme der Nisinkonzentration in einer<br>Bouillon                                               | 52           |
| 15. Resistenzsteigerungen von Bakterien nach<br>subletalen Dosen von Nisin                            | 52           |
| 16. Das Verhalten nisinresistenter Staphylokok-<br>ken gegenüber anderen Antibiotika                  | 58           |
| 17. Untersuchungen zum Nachweis einer "Nisinase"                                                      | 60           |
| 18. Abnahme der Nisinresistenz                                                                        | 64           |
| 19. Verhalten von antibiotika-resistenten<br>Staphylokokken gegenüber Nisin                           | 65           |
| 20. Einwirkung der Penicillinase auf Nisin                                                            | 67           |
| 21. Nisin-Blutspiegel                                                                                 | 68           |
| 22. Komplementtiter nach Nisingaben                                                                   | 70           |
| 23. Künstlicher Herdinfekt und Nisin                                                                  | 75           |
| 24. Tetanusinfektion und Nisin                                                                        | 77           |
| 25. Grippe-Viren und Nisin                                                                            | 79           |
| 26. Nisinwirkung bei Vireninfektionen                                                                 | 81           |
| 27. Zusammenfassung                                                                                   | 84           |
| 28. Literaturverzeichnis                                                                              | 87           |

## I. Teil

### 1. Einleitung und geschichtlicher Überblick

Die Resistenzzunahme verschiedener Bakterien gegenüber bekannten Antibiotika veranlaßte uns, die antibakteriellen Eigenschaften eines Stoffwechselproduktes von *Streptococcus lactis*, das sogenannte Nisin, zu untersuchen. Das Präparat stellte uns freundlicherweise die Firma APLIN and BARETT, Yeovil/England, zur Verfügung. Zunächst soll versucht werden, einen kurzen Abriss der bisher im Schrifttum erschienenen Arbeiten über Nisin zu geben.

Mit dem Bewußtwerden der Gesetze unseres materiellen Lebens stellten H. SMITHINBANK und G. NEWMAN (23) schon 1903 fest: "... es gibt ein sog. intracelluläres Gift, das in den Mikroorganismen enthalten ist und bei verschiedenen Bakterienarten beobachtet wurde. Diese Substanz kann im Laufe von 48 Stunden unter günstigen Bedingungen in der Milch (von bestimmten Bakterien) gebildet werden und ist sehr wirksam gegen andere Bakterien, die in ihr enthalten sind."

Wahrscheinlich bemerkte als nächster ROGERS 1928 (39), daß eine Substanz von bestimmten milchsäurebildenden Bakterien entwickelt wurde, die hemmend auf das Wachstum anderer Bakterien einwirkte. ROGERS untersuchte die Wirkung dieser Substanz u.a. im Verdünnungstest. Er bedachte auch die Möglichkeit, daß das Ergebnis durch Laktate erklärt werden könnte. Zu einem definitiven Ergebnis kam er nicht.

1933 beschrieben WHITEHEAD und RIDDET (42 u. 43) einen grampositiven, damals nicht weiter unterschiedenen Milchsäurestreptococcus, der in der Milch gefunden wurde, wenn sie eine Verzögerung der Säurebildung erfuhr. Die gebildete Substanz dieser Milchsäurestreptokokken sahen sie als ein Protein an (29). Eine Beziehung zu dem Wasser eines bestimmten Brunnens glaubten WHITEHEAD und RIDDET feststellen zu können, das nach ihrer Annahme diese besondere Art von Streptococcus lactis zu enthalten schien.

MATTICK und HIRSCH (29) untersuchten das Phänomen zum ersten Mal eingehend und beschrieben 1944 eine hemmende Substanz, die sie bei Milchsäurestreptokokken der Gruppe N feststellten. Die Versuche ergaben: Die gewonnene rohe Substanz wird s.c. und i.v. gut vertragen. Eine Einwirkung auf die bovine Mastitis ist evident. Clostridien, Lactobakterien und andere Bakterienarten werden in ihrem Wachstum gehemmt. Demgegenüber erweisen sich Staphylokokken als weniger beeinflussbar, als unempfindlich werden gramnegative

Bakterien erkannt. Zur gleichen Zeit (1944) entwickelte OXFORD (35) aus *Streptococcus cremoris* das Diplococcin. Dieses besitzt aber keine besondere Wirkung, verglichen mit der aus *Streptococcus lactis* gewonnenen Substanz. 1946 wird die entwickelte Substanz von MATTICK und HIRSCH (30) als "Nisin" bezeichnet und in vitro gegenüber Tuberkelbakterien als wirksam beschrieben. Es dürfte weiter interessieren, daß sich mit der Aufklärung der chemischen Konstitution vor allem BERRIDGE (22) beschäftigt hat. Er stellte als erster aus hohen Nisinkonzentrationen Nisinkristalle her und erkannte mit Hilfe des Gegenstromprinzips die verschiedenen Fraktionen des Nisins.

## 2. Gewinnung und Wachstum von nisinbildenden Milchsäurestreptokokken und die Nisinpräparation

Von FLOREY, CHAIN u.a. (14) wurden etwa 10 000 aus menschlichem Halsschleim, roher und pasteurisierter Milch, Käse, Faeces von Mensch, Kuh und Schwein gewonnene Streptokokkenarten untersucht. Nur 26 Stämme der Gruppe D und 2 Stämme der Gruppe F hemmten andere Bakterienarten. Der Hemmtiter lag durchschnittlich bei einer Verdünnung von  $1/8$  bis  $1/16$ . Nur der Strept. lact. zeigte einen Hemmtiter von  $1/320$  und kann somit als der eigentliche und fast einzige Antibiotika bildende Streptokokkenstamm angesehen werden. Bei diesen Testen ist jedoch gleich-

zeitig zu beachten, daß die Hemmungszonen bei Streptokokkenkolonien auch von der Wasserstoffsuperoxyd- und Milchsäurebildung mitbestimmt werden. Doch beruht die Wirkung dieser Stoffe auf einer Unterstützung der hemmenden Funktionen des Antibioticum. Mit einem Milchsäurestreptokokkenstamm der Gruppe N arbeitete HIRSCH und berichtete im Jahre 1951 (20): 1944 bildete der Stamm 354 mehr Nisin in Milch als in Fleischbrühe. Bei fortlaufender Subcultivation in Fleischbrühe verlor dieser Stamm seine Fähigkeit, Milch zu verklumpen, und entwickelte mehr Nisin in Fleischbrühe als in Milch. Dieser "auf Fleischbrühe trainierte" Stamm konnte nicht wieder dazu gebracht werden, Milch auszufällen. Die in Fleischbrühe gehaltenen Kulturen nahmen in ihrer Fähigkeit, Nisin zu bilden, allmählich ab, und die gewöhnlichen Konzentrationen von 80 E/ml<sup>\*</sup>) fielen auf 20 E/ml. Daraufhin wurden die ursprünglichen Milchkulturen auf Yeastrel-Glucose-Agar ausgestrichen und einzelne Kolonien untersucht. Von 24 neuen Stämmen, die isoliert wurden, bildeten 21 in Milch mehr Nisin als in Fleischbrühe, 2 produzierten gleiche Mengen und nur 1 Stamm (354/07) entwickelte mehr Nisin in Fleischbrühe als in Milch. Nach seiner Isolation

---

\*) 1 E (Einheit) war ursprünglich die Menge, die benötigt wurde, Strept. agalact. in 1 ml Nährbouillon zu hemmen. Später wurde die Einheit durch Vergleich mit einer Standardlösung präziser definiert. Kristallines Nisin enthält annähernd  $40 \times 10^6$  E/g.

wurde der Stamm 354/07 auf Platten übertragen und einzelne Kolonien aufgesucht. 40 getestete Kulturen waren im Vergleich zum Stamm 354/07 ohne Ausnahme gute Nisinbildner.

Dieser letzte Stamm ist seit 6 Jahren ohne signifikante Änderung in Gebrauch und wurde auch von BERRIDGE verwendet. Es ist nicht bekannt, ob alle Stämme von 354/07, die heute benutzt werden, noch homogen sind.

Ferner teilte HIRSCH (19) mit, daß er nach vierjährigem Einfrieren besonders gut nisinbildende Bakterien erhielt. Dieser wieder aufgetaute Stamm entwickelte in höherem Maße (das 5- bis 6fache) Nisin als die ursprüngliche Kultur. Die hemmende Wirkung wurde gegenüber Strept. dysgal. untersucht. HIRSCH schließt daraus, daß ähnliche, aber nicht identische Antibiotika gebildet werden und daß vielleicht derselbe Stamm verschiedene Antibiotika zu bilden in der Lage ist.

Über das Wachstum von Milchsäurestreptokokken und die Gewinnung von Nisin finden wir die ersten ausführlichen Angaben bei MATTICK und HIRSCH im Jahre 1947 (30). Als Nährmedium wird folgende Flüssigkeit verwendet:

|                                |      |                                             |        |
|--------------------------------|------|---------------------------------------------|--------|
| Glucose .....                  | 15 g | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....              | 10,0 g |
| "Yeastrel" .....               | 7 g  | $\text{MgSO}_4$ .....                       | 0,2 g  |
| Na-citrat .....                | 6 g  | $\text{NaCl}$ .....                         | 3,0 g  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ..... | 10 g | mit dest. Wasser auf<br>1 000 ml auffüllen. |        |

Der Nährboden wird mit etwa 1 % seines Volumens einer 24-Stunden-Bouillon von Strept. lact. 354 beimpft und bei 30° C 48 Stunden belassen. Der pH-Wert sinkt währenddessen von 7,2 auf etwa 4,4.

Gleichzeitig steigt der Nisingehalt auf etwa 80 E/ml an. Durch Säuerung auf pH-Werte unter 3 diffundiert das zunächst in den Zellen sich befindende Nisin in die Nährflüssigkeit hinüber. Darauf wird die Nährflüssigkeit durch Zentrifugieren von den Bakterien getrennt, mit Chloroform versetzt und durch Extraktionsprozesse schließlich das Nisin gewonnen.

HIRSCH (20) beschäftigte sich weiterhin mit dem Problem der Nisingewinnung und stellt fest, aufbauend auf die Anschauungen von ROGERS und WHITTIER, daß die fortwährende Beseitigung der gebildeten Milchsäure einen höheren Ertrag an Nisin bringt. Hierbei wurde durch ständige Zugaben von NaOH bei gleichzeitiger Messung des pH-Wertes die Nährflüssigkeit auf einem pH-Wert von 6 gehalten. Außerdem setzte HIRSCH der Nährlösung einer Fleischextrakt-Pepton-Bouillon 0,6 mg/ml Ca-panthothenat und 2,5 % Glucose zu. Die Pantothen Säure scheint für einen optimalen Verbrennungsprozeß, der sich in der Glucolyse manifestiert, unentbehrlich zu sein. Der Wirkungsmechanismus kann als eine Anreicherung von Coenzym A und somit gesteigerte Acetylierung verstanden werden.

Einen Niederschlag der gewonnenen Erkenntnisse finden wir in der Beschreibung der Patenturkunde von 1951 (36): Das Nährmedium enthält 1 % Glucose; 0,6 % eines künstlichen Hefehydrolysates (Yeastex), welches essentielle Aminosäuren enthält; 0,00003 % Ca-pantothenat; 0,3 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 0,1 %  $\text{MgSO}_4$ , da sich herausstellte, daß Sulfationen unentbehrlich für ein gutes Gedeihen der Bakterien sind. Das Nährmedium wird 30 Minuten dampfsterilisiert und dann auf  $30^\circ \text{C}$  abgekühlt. Während der Sterilisation sinkt der pH-Wert von 7,2 auf 6,7 herab. Die Inoculation erfolgt mit einer Reinkultur von Strept. lact., Gruppe N Lancefield. Ein ständiges Umrühren der Bouillon ist erforderlich, und die Temperatur muß auf etwa  $50^\circ \text{C}$  gehalten werden. Nach Beginn des Bakterienwachstums wird durch Hinzufügen von 40 %iger NaOH-Lösung die gebildete Milchsäure neutralisiert und der inzwischen auf 6 herabgesunkene pH-Wert in den Grenzen von 5,9 bis 6,1 belassen. Das Ende des Prozesses ist gekennzeichnet durch ein abruptes Aufhören des Stoffwechsels. Die Bouillon, die bis zu 1819 IE/ml Hicin enthält, weist nur 15 % Hicin im freien Medium auf, 85 % des Hicins sind an die Zellstruktur gebunden.

Zur Präparation des Hicins wird der Flüssigkeit Hicolsäure zu 0,1 % beigegeben und die Aufschwemmung filtriert. Der Filterrückstand versetzt man mit

60 %igem Aceton, das mit HCl auf pH 2 angesäuert ist. Nach abermaliger Filtration wird der Extrakt unter geringem Druck evaporiert, bis das Aceton beseitigt ist. Dem wässrigen Konzentrat fügt man 3 %ige NaCl-Lösung hinzu. Nachdem sich alles gelöst hat, wird das sich bildende Präzipitat durch Filtration gewonnen. Diese Substanz wird in einer minimalen Menge von 70 %igem wässrigem Aceton bei 40° C gelöst und auf 0° C abgekühlt, nachdem man einen kleinen unlöslichen Rest beseitigt hat. Die Nisinkristalle, die sich bilden, werden abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und durch Äther getrocknet.

### 3. Chemische Untersuchung des Nisins

Mit Hilfe des Gegenstromprinzips, ausgeführt in einem 102-tube all-glass apparatus (13), erreichten BERRIDGE, NEWTON und ABRAHAM (5; 8) eine Trennung des Nisins in verschiedene Fraktionen, die sie Präparate A - E nannten.

BERRIDGE (5) verwendete bei dieser Methode ein gereinigtes Präparat der Firma Bongers (Präparat 706 P) und löste dieses in einem System aus Methanol, n-Butanol und Acetatpuffer von pH 3 auf. Trotz der schlechten Löslichkeit von Nisin in dem Lösungsmittel wurde dieses bevorzugt, weil der Verteilungskoeffizient bei 1 lag und bei dem verwendeten pH-Wert einige Bestandteile der Moleküle teilweise ionisiert zu sein schienen. Es ergaben sich hieraus

Löslichkeitsunterschiede, die infolge verschiedener Dissoziationskonstanten auftreten. Zusätzlich war das Nisin in dem benutzten Solvens besonders stabil. Eine Anzahl von Lösungen wurden 1 Monat bei Raumtemperatur aufbewahrt, ohne einen Verlust ihrer antibakteriellen Eigenschaften zu zeigen. Daher ist eine chemische Veränderung während des Versuches nicht anzunehmen. Nach einer Methode von CRAIG wurde das Nisin 150 trennenden Operationen unterworfen.

Die Messung des Nisingehaltes in den verschiedenen Gläsern erfolgte entweder mit einer Mikromethode nach KJELDAHL oder mit Hilfe einer Ninhydrin-Farbreaktion. Als Ergebnis theoretischer Überlegungen und praktischer Durchführungen ergab sich u.a. die graphische Darstellung Abb. 1.

Die Summenkurve zeigt 2 Gipfel. Bei der Kurvenanalyse konnte BERRIDGE nachweisen, daß sich die Summenkurve aus 5 Einzelkurven konstituierte. Dieses Ergebnis ließ die Folgerung zu, daß das Präparat Nisin sich aus 5 verschiedenen Fraktionen zusammensetzt, und zwar, wie die quantitative Bestimmung ergab, zu 49 % aus der Substanz A, 32 % B, 12 % C, 5 % D und wahrscheinlich zu 3 % aus einer anderen Substanz E. Aus folgender Tabelle, die wir BERRIDGE (8) entlehnen, geht die antibakterielle Aktivität der verschiedenen Fraktionen hervor (s. Tab. 1). Sie zeigt, daß die Nisinpräparate A und B eine fünffach höhere antibakterielle Wirkung besitzen als die Präparate C und D.

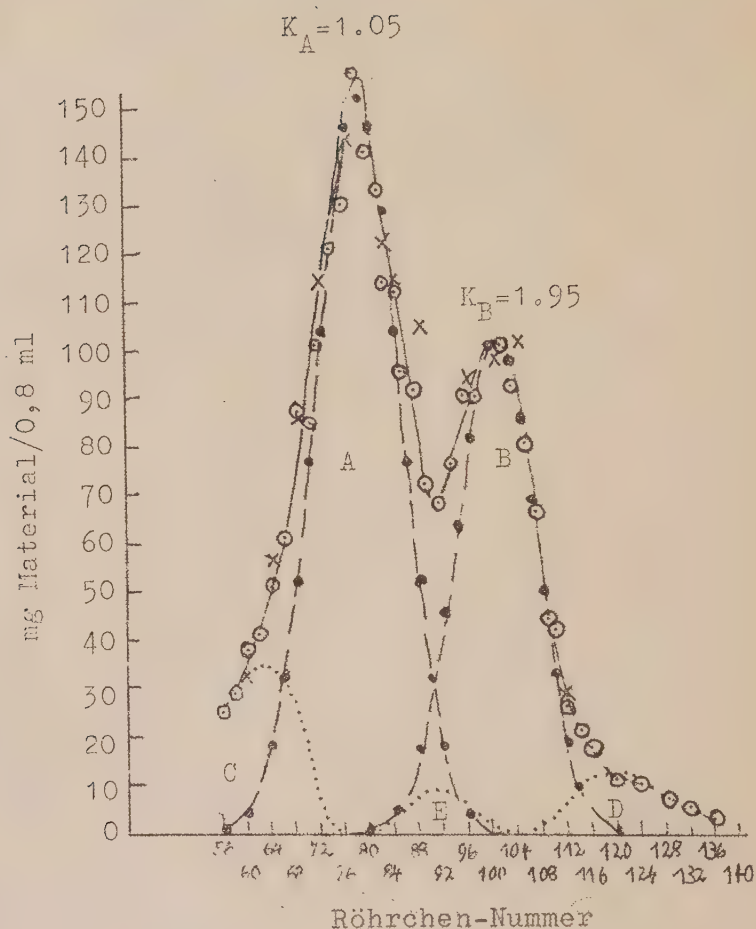


Abb. 1

Verteilungskurve der Bestandteile des Misins nach Trennung der einzelnen Fraktionen in einem spezifischen Lösungssystem.  $\bigcirc$ — $\bigcirc$  mg Material/0,8 ml kolorimetrisch bestimmt.  $\times$ — $\times$  mg Material/0,8 ml mit der Mikromethode nach KJELDAHL bestimmt.  $\bullet$ — $\bullet$  errechnete Kurve. .... angenäherte Darstellung der verbleibenden Substanzen.

| Nisin-Fraktion | Röhrchen-Nr. | E/mg der Fraktion gegenüber Strept. agal. |
|----------------|--------------|-------------------------------------------|
| A              | 76 - 81      | 32 000                                    |
| B              | 102 - 108    | 41 500                                    |
| C              | 56 - 62      | 10 - 5 000                                |
| D              | 116 - 140    | 10 - 5 000                                |
| E              | 90 - 94      | nicht bekannt                             |

Tab. 1

Die antibakterielle Wirksamkeit der verschiedenen Fraktionen A - E des Nisins, getestet am Strept. agalactiae. Die einzelnen Fraktionen des Nisins wurden nach dem im Text beschriebenen Gegenstromprinzip isoliert.

#### Aminosäurenbestandteile des Nisins:

BERRIDGE und Mitarbeiter geben weiter an, zu welchem Prozentsatz Aminosäuren am Aufbau der Nisinpräparate A - D beteiligt sind. Sie verwendeten zweidimensionale Papierchromatogramme (11). Die Nisin-Säurehydrolysate wurden zunächst durch Butanol-Essigsäure in der Längsrichtung, durch Phenol in der Gegenwart von Essigsäuredämpfen in der Querrichtung zum Wandern gebracht. Es ergab sich hierbei, daß die Chromatogramme von A, B und C sich weitgehend ähneln, während kleinere Unterschiede gegenüber D bemerkbar sind. Eine Untersuchung zeigte, daß Leucin oder Isoleucin, Alanin, Glycin, Prolin, Asparaginsäure, Histidin und Lysin in allen 4 Präparaten enthalten sind. Valin und Methionin scheinen im Präparat D zu fehlen. Nur zwei

Aminosäuren ließen sich nicht direkt als Bestandteile üblicher Proteinhydrolysate einordnen. Durch Diffusionsvergleiche und chemische Umwandlungen konnte BERRIDGE auf Lanthionin und Cystathionin oder Allocystathionin schließen. Zusätzlich bestätigte die Elementaranalyse den hohen Schwefelgehalt des Nisinhydrochlorids mit 5,6 %. Nachdem BERRIDGE und Mitarbeiter dieses erkannt hatten, stellten sie eine Mischung von folgenden Aminosäuren in den angegebenen Verhältnissen her: Leucin 4, Valin 2, Alanin 2, Glycin 2, Prolin 2, Serin 1, Lysin 2, Histidin 2, Asparaginsäure 1, Methionin 2, Lanthionin 2, Cystathionin 4 Teile. Es ergab sich ein gleiches Papierchromatogramm wie das der Hydrolysate der Nisinpräparate A bis C.

Lanthionin finden wir in dem Antibioticum Subtilin, einem Polypeptid, das von einem Stamm Bac. subt. gewonnen wird und, ähnlich dem Nisin, einen hohen Schwefelgehalt (4,8 %) zeigt (34). Es enthält vielleicht auch Cystathionin oder Allocystathionin. Obwohl sich Subtilin (27) eindeutig von Nisin unterscheidet - Nisin enthält kein Tryptophan, Subtilin kein Methionin - zeigen diese beiden Antibiotika einige weitgehende Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäurezusammensetzung und in ihrem antibakteriellen Verhalten.

#### 4. Physikalische Eigenschaften des Nisins

Eine Zusammenfassung der physikalischen Eigenschaften des Nisins finden wir bei BERRIDGE (4).

Die Messung des Diffusionskoeffizienten ergab als wahrscheinlichen Wert  $14 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$  für Nisin.

Die Werte fielen bei verschiedenen Versuchen verschieden aus. Aus dieser Größenordnung läßt sich folgern, daß Nisin wahrscheinlich ein kleines Protein niederen molekularen Gewichtes bzw. ein großes Polypeptidmolekül ist.

Nisinlösungen zeigen eine hohe Oberflächenaktivität.

Enthalten sie mehr als 7,5 mg/ml (ungefähr 10 000 E/ml) Nisin, so können sie als oberflächenaktives Kationenmaterial verwendet werden (18).

Nisinpuder scheint bei üblicher Temperatur unbegrenzt lange haltbar zu sein.

Bei niedrigen pH-Werten löst sich Nisin sehr gut. Z.B. haben bei einem pH-Wert um 4,2 gesättigte Lösungen von kristallinem Nisin eine Aktivität von 600 000 E/ml (1,5 g.). Nisinlösungen bei pH-Werten von 1,8 - 2,0, etwa 5 - 10 Minuten lang gekocht, neigen vielleicht zu einer leichten Vermehrung der Aktivität des Nisins. Gesättigte Lösungen, die durch Auflösen von Niskristallen in verd. HCl hergestellt werden, können in diesem pH-Bereich in einem offenen Becherglas gekocht werden. Dagegen ist es in einem pH-Bereich von 4,2 ratsam, gesättigte Lösungen nur 10 Minuten lang kochen zu lassen, um keinen Verlust der Aktivität zu

erleiden. Autoclavieren (0,703 atü für 10 min) zerstört jedoch etwa 50 % der Wirksamkeit.

Eine vollständige Inaktivierung des Nisins fand sich nach 2 Minuten langem Kochen in einer 2 n-HCl. Ein erheblicher Wirksamkeitsverlust tritt in alkalischem Milieu ein. Auch  $K_2MnO_4$  bei saurer Reaktion wirkt inaktivierend.

Es zeigte sich weiterhin, daß Nisin bei einem pH-Wert von 7 nur langsam durch Agar diffundiert. - Nisin kann bei einem pH von 6,8 und einer Temperatur von  $37^{\circ}C$  seine Aktivität in Traubenzucker-Bouillon höchstens 24 Stunden auf etwa gleicher Höhe halten. Nisinlösungen sind erst bei einem pH von 1,8 für Wochen stabil.

Jene organischen Substanzen, die Nisin gut lösen, zerstören auch deren Aktivität; als Beispiel wäre Essigsäure oder Benzylalkohol zu nennen. Nur Ethanol (80 %) und Formamid sind wohl Ausnahmen von dieser Regel.

Ähnliche Angaben wie bei BERRIDGE finden sich bei HIRSCH (20). HIRSCH stellte außerdem eine Tabelle über die Inaktivierung des Nisins durch Erhitzen, durch Veränderung des pH-Wertes und durch Filtration (Seitzfilter) zusammen.

### 5. Definition der Nisin-Einheit

MATTICK und HIRSCH (30) gehen bei der Festlegung ihrer Einheit von einem teilweise gereinigten Nisinpräparat aus. 1 Einheit (unit) sehen sie als die Menge an, die, gelöst in  $n/20$  HCl, dieselbe Hemmung ergibt wie das ebenfalls in  $n/20$  HCl gelöste Standardpräparat.

BERRIDGE definiert in folgender Weise (4):

Ein bestimmtes Nisinpräparat wird als Standardpräparat gewählt und enthält 1,3 E/mg. 1 Einheit in 1 ml Fleischbrühe wird normalerweise das Wachstum der Testbakterien Strept. agalact. gerade hemmen. BERRIDGE gibt an, daß seine Definition der Nisineinheit etwa der von MATTICK und HIRSCH gleicht.

### 6. Nachweismethoden des Nisins in vitro

Verschiedene Methoden wurden genutzt, um die hemmende Wirkung des Nisins in vitro nachzuweisen:

- A: Agarplattentest
- B: Mikroskopische Methode
- C: Verdünnungstest
- D: Methylenblautest
- E: Polarimetrisches Verfahren
- F: Bakteriziditätstest

#### A: Agarplattentest

Der Agarplattentest ist praktisch nicht verwertbar (30); weil bei einem pH von 7 das Nisin nicht in der Lage ist, durch den Agar zu diffundieren.

B: Mikroskopische Methode

In älteren Versuchen (1) verglich man die Zellzahl des Testbakteriums *Lactobact. casei*, die in einer normalen und einer den Hemmstoff enthaltenden Magermilch nach gleicher Beimpfung und Bebrütung festgestellt wurden.

C: Verdünnungstest

In der Nisinliteratur werden verschiedene Ausführungen des Verdünnungstestes beschrieben. MATTICK und HIRSCH (30) geben folgende Methode an:

Die geometrische Verdünnungsreihe der zu testenden Nisinlösung wird mit einer 1 % Glucose-, 0,3 % Lemco-, 0,5 % Evans-Pepton-Bouillon angesetzt. Eine 24-Stunden-Bouillon von *Strept. agalact.*, die 1:1000 verdünnt ist, dient als Impfgut. Wachstumskontrollen, die keine hemmende Substanz enthalten, und sterile Kontrollen, die nur aus dem Nährmedium und dem Hemmstoff ohne Beimpfung mit dem Teststamm bestehen, werden als Gegenproben geführt. Die Versuchsröhrchen werden bei 37° C gewöhnlich 16 - 20 Stunden bebrütet. Als Anzeichen gilt ein sichtbares Wachstum in den Wachstumskontrollen. Der Titer des Röhrchens, in dem noch kein Wachstum sichtbar ist, soll als Maßstab für die Hemmkraft dienen.

Eine kleine Abwandlung dieses Verdünnungstestes wäre z.B. die Benutzung einer arithmetischen statt einer geometrischen Verdünnungsreihe.

Der Verdünnungsversuch eignet sich in bestimmten Grenzen auch zum Nachweis einer bakteriostatischen und bakteriziden Wirkung des Nisins (4). Wenn man das Ergebnis nach etwa 16 und 40 Stunden abliest, so ist es möglich, daß Röhrchen, die zunächst kein Bakterienwachstum zeigten, nach 40 Stunden eine Trübung aufweisen. Das verzögerte Wachstum in diesen Konzentrationsbereichen des Nisins kann man als bakteriostatisch auffassen.

Die Wirkung des Nisins auf Milchsäurebildner wurde auch durch Messung des pH-Wertes der Bouillon, z.B. nach 10 und 16 Stunden, nachweisbar.

#### D: Methylenblautest

Interessant ist die Einführung des Methylenblauversuches (12), da er eine wesentlich schnellere Klärung der Hemmstoffwirkung herbeiführt. Üblicherweise wird eine Verdünnungsreihe von 1/10 bis 1/100 hergestellt. Die Verdünnung der unbekannten Lösung erfolgt mit destilliertem Wasser. Jeweils 1 ml dieser Verdünnung werden 9 ml einer 1P5-Milch\*) zugesetzt. Die Untersuchungsgläser mit dieser Hemmstoff-

---

\*) 1P5 ist ein schnell wachsender Streptokokkenstamm, der täglich in sterile Milch überimpft und bei 22° C bebrütet wird. Von dieser Ausgangskultur wird eine warme Milch 1:10 beimpft und 1 Stunde bei 30° C im Brutschrank aufgehoben. Diese 1P5-Milch soll in etwa 1 Minute Methylenblau reduzieren und nach 1 Stunde bei 30° C gerinnen.

1P5-Milch werden für 10 - 15 Minuten in ein Wasserbad von  $50^{\circ}\text{C}$  gesetzt, dann das Methylenblau hinzugegeben und weitere 5 Minuten bebrütet. Wenn die Gläser genügend Hemmstoff enthalten, bleibt die Farbe des Methylenblau bestehen, während die anderen Gläser farblos werden.

Im Methylenblautest verhielten sich *Strept. agalact.* und *Mycobact. phlei* in gleicher Weise. Der *Strept. cremoris* (1P5) war gegenüber Nisin ungefähr viermal empfindlicher als *Strept. agalact.* Dennoch zeigte sich eine weitgehende Kokordanz zwischen den 2 Teststämmen.

#### E: Polarimetrische Methode

Als weitere Variation des Verdünnungstestes kann die polarimetrische Methode (7) angesehen werden, die von BAREBO und FOSTER (1) beschrieben wurde. Eine Abwandlung, um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, besteht in folgender Methode:

Zu 9 ml einer sterilen Hefeextrakt-Glucose-Trypton-Bouillon wird 1 ml der hemmenden Substanz hinzugefügt. Als Kontrolle dient ein gleiches Nährmedium, das an Stelle der hemmenden Substanz z.B. Aqu. dest. enthält. Auch Vergleichslösungen mit bestimmten Nisinkonzentrationen könnte man beispielsweise verwenden. Die Testgläser werden mit 0,1 ml einer 24-Stunden-Bouillon von *Lactobac. casei* oder anderen Testbakterien beimpft. Darauf folgt die Bebrütung. Das Wachstum der Bakterien läßt sich in bestimmten Zeit-

abständen mit einem Evelyn-photo-electric-colorimeter, das einen Filter von 620 m $\mu$  besitzt, kontrollieren. Die Stimulation oder Hemmung des Wachstums der Bakterien stellt man durch die Zunahme der Drehung des polarisierten Lichtes fest. Das Ergebnis wird in Prozenten ausgedrückt:

$$\frac{\text{Drehung des Lichtes durch die Testkultur}}{\text{Drehung des Lichtes durch die Kontrolle}} \times 100 = \text{Prozent}$$

Wiederholte Bestimmungen mit dieser Methode ergaben bei gleicher Nisineinheit eine Schwankung von  $\pm 5\%$ . Eine genaue Beschreibung der polarimetrischen Methode finden wir bei BERRIDGE und BARETT (7). Sie betonen, daß es vor allem darauf ankommt, eine Kultur in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu verwenden.

#### F: Bakteriziditätstest

Der Bakteriziditätstest wurde von HIRSCH beschrieben (18). Er beruht auf folgendem Prinzip:

Gibt man zu einer im Wachstum begriffenen Strept.-agalactiae-Kultur verschiedene bakterizid wirkende Nisinkonzentrationen, so verändert sich die Zellzahl entsprechend der einwirkenden Konzentration. Die Keimzahl wird nach Verdünnung des Testmediums mit Hilfe der Blutagarplatte bestimmt. Dieser Versuch ist genauer als die Verdünnungsmethode.

Abschließend sei bezüglich der beschriebenen Nachweismethoden darauf hingewiesen, daß bei verschiedener Versuchsanordnung die Ergebnisse voneinander ab-

weichen können.

### 7. Eigenschaften des Nisins in vitro

Aus den Wachstumstesten leitet HIRSCH (18) ab, daß Nisin nicht nur bakteriostatisch, sondern auch bakterizid wirkt. In niedrigen, für die Bakterien subletalen Dosen, verlängert Nisin die Wachstumsphase. Außerdem kann es bei diesen Nisinkonzentrationen zu schnellwachsenden, resistenten Bakterienstämmen kommen.

In vitro Versuche von MATTICK und HIRSCH (22) zeigen an Hand einer graphischen Darstellung, in der die Zellzahl von *Strept. agal.* bei verschiedenen Nisinkonzentrationen in bestimmten Zeitabständen gemessen wird, daß die bakteriostatische und bakterizide Wirkung innerhalb der ersten Minuten besonders stark ist (s. Abb. 2).

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich in vivo. Mäuse, die mit *Strept. pyogenes* infiziert worden waren, erhielten eine einzige subcutane Injektion von 2000 U. In gewissen Zeitabständen wurden die Mäuse getötet und die Zellzahl des Herzblutes auf Blutagar bestimmt. Der Versuch ergab eine 95%ige Reduktion der Zellzahl in den ersten 5 Minuten. Graphisch gleicht die Kurve der oben angeführten Darstellung des in vitro Versuches. Andere Antibiotika, z.B. Penicillin, verlangten mehrere Stunden, bis ein ähnlicher Rückgang der Keimzahl sich zeigen ließ.

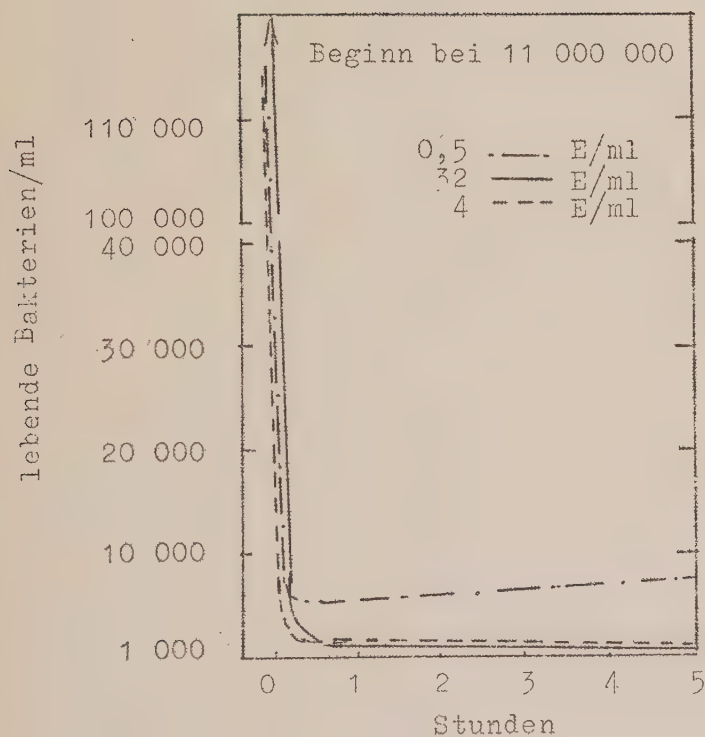


Abb. 2

Die zeitliche Veränderung der Zellzahl von lebenden Strept. agalact. nach einer Nisingabe in vitro.

Es liegen zahlreiche Testungen gegenüber Bakterien vor (s. Tabelle 2 von MATTICK und HIRSCH (30)). Mycobakterien wurden von denselben Autoren (22) in LONG's synthetischem Nährboden gegen Nisin getestet und ergaben folgende Ansprechbarkeiten (s. Tab. 3).

| Nisin-empfindliche Bakterien                | Zahl der Stämme od. Arten | Zur Hemmung erforderlich E/ml |
|---------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Streptokokken der Gruppe A-M, außer C, D, L | 17                        | 0,25-4,0                      |
| Pneumokokken, Typ I .....                   | 2                         | 0,25                          |
| Pneumokokken, Typ II .....                  | 2                         | 100                           |
| Staphylococcus pyogenes ....                | 6                         | 100                           |
| Weisseria .....                             | 3                         | 2-50                          |
| Bacillen .....                              | 6                         | 2-4                           |
| Clostridium (septicum) .....                | 8                         | 0,25-80,0                     |
| Corynebakterien .....                       | 12                        | 4-120                         |
| Actinomyces .....                           | 6                         | 1-10                          |
| Mycobacterium tuberculosis .                | 6                         | 100-500                       |
| Erysipelothrix monocytogenes ,              | 3                         | 2,0                           |

Tab. 2

Nisinkonzentrationen, die erforderlich sind, um in vitro die aufgeführten Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu hemmen (Tabelle von MATTICK und HIRSCH (30)).

Als hemmende Nisinkonzentration wurde diejenige angesehen, die einer Entwicklung von "Häutchen" vorbeugte. Die Tabelle zeigt, daß 100 - 500 E/ml Nisin für eine Hemmung erforderlich sind. Als die Versu-

che mit einem Medium nach DUBOS und DAVIS, das Tween 80 enthielt, wiederholt wurden, waren nur 1 - 3 E/ml zur gleichen Hemmung der Mycobakterien nötig. Ähnliche Ergebnisse mit diesem Zusatz sieht man auch bei anderen Antibiotikatesten. In dem Nährmedium nach DUBOS und DAVIS scheint Nisin, gewichtsmäßig verglichen, die gleiche Wirksamkeit wie Streptomycin zu besitzen.

| Bakterienstämme                       | gehemmt<br>bei E/ml | nach 18tägiger<br>Einwirkung |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Mycob. phlei.                         | 300                 | -                            |
| Mycob. tuberculosis<br>(aviane) D 4   | 300-600             | lebend                       |
| Mycob. tuberculosis<br>(humane) C     | 100-600             | tot                          |
| Mycob. tuberculosis<br>(humane) DT    | 300                 | tot                          |
| Mycob. tuberculosis<br>(bovinum) AN 5 | 300                 | tot                          |
| Mycob. johnei III und V               | 1 000               | lebend                       |

Tab. 3

Die Wirkung von Nisin auf Mycobakterien in LONG's Nährmedium

HAPTICK und HIRSCH kombinierten in der DUBOS-DAVIS-Bouillon Nisin mit anderen Antibiotika und stellten fest, daß kein Synergismus oder eine additive Wirkung zwischen Nisin und Streptomycin oder Nisin und Licheniformin vorlag. Kombinationen der 3 Antibiotika (Nisin, Streptomycin, Licheniformin) führten zu

einer stärkeren Wirksamkeit, die aber ebenfalls nicht als eine einfache Addition aufzufassen ist. Ein ähnliches Verhalten ist von der Kombination Nisin, Licheniformin und Sulfathiazol zu berichten.

Gegenüber verschiedenen Antibiotika ließen sich leicht resistente Mycobakterienstämme züchten. Doch sprachen diese noch auf andere Antibiotika an. Da nun zwischen der Schwere der Tuberkulose-erkrankung und der Ansprechbarkeit der Tuberkulosebakterien auf Streptomycin mitunter Beziehungen bestehen, kann bei einem streptomycin-resistenten Stamm evtl. Nisin als Therapeuticum Verwendung finden.

#### 8. Eigenschaften des Nisins in vivo

DERRIDGE (3) beschrieb Nisin-Konzentrationsbestimmungen, die er am Citrat-Blut durchführte, und stellte dabei fest, daß sich eine ähnliche Konzentration von Nisin im Blutplasma und in den Blutkörperchen einstellt. Die Nisinlöslichkeit im Blut beträgt mindestens 5 000 E/ml.

Zunächst schien aus den Überlegungen hervorzugehen, daß das Nisin als Pepton in dem enzymatischen System des Blutes schnell abgebaut werden müßte. Es zeigte sich aber, daß eine Konzentration von 6000 E je ml bei 37° C bis zu 22 Stunden in gleicher Höhe im Blut nachgewiesen werden konnte. Ein anderer

Versuch ergab für eine Nisinkonzentration von 25 E/ml unter ähnlichen Bedingungen eine gleiche Nisinstabilität.

MATTICK und HIRSCH (30) bestimmten nach subcutaner Applikation eines unreinen Präparates die LD 50 bei Mäusen auf etwa 3,5 g/kg. Mit dem gereinigten Präparat sind weitere Versuche zur Bestimmung der LD 50 nicht durchgeführt worden. Doch glaubten MATTICK und HIRSCH, die Toxizität an Hand von Nisin-Konzentrationsbestimmungen im Blut, die sie an etwa 30 Kaninchen vornahmen, abschätzen zu können. Das Ergebnis zeigt, daß die Verträglichkeit von gereinigtem Nisin von der Injektionsweise abhängt. I.v. gegeben waren 5 Mill. E (= 33 mg/kg) immer tödlich, dagegen zeigten 3 Mill. E (= 20 mg/kg) bei Kaninchen Krankheitssymptome und Gerinnungsanomalien. Die i.v. LD 50 muß also zwischen 20 und 30 mg/kg Nisin liegen. Bei i.m.-Injektion fanden MATTICK und HIRSCH die LD 50 im Bereich von 200 mg/kg, s.c. injiziert war sie höher als 1000 mg/kg.

Kaninchen, die eine tödliche Dosis Nisin i.v. erhalten hatten, starben innerhalb weniger Minuten ohne auffällige Symptome. Dagegen führten ähnliche Versuche bei Meerschweinchen zu heftigen Spasmen. Beide Symptome sollen sich unter den Begriff des "Pepton-schocks" (WILSON und MILES) einordnen lassen. Die Zeichen des Peptonchocks treten nicht auf, wenn das Präparat sehr langsam gegeben wird, z.B. mit einem Tropfgerät. Eine gleiche Dosis Nisin langsam oder

schnell injiziert ergab keinen Unterschied in der Letalität.

Bei s.c.-Injektionen, vor allem von unreinem, nicht kristallinem Nisin, treten örtliche Ödeme, evtl. schwere Nekrosen auf. I.v. appliziert besteht die Gefahr der Venenthrombose.

Nach dem Ableben der Tiere wurden Niere, Leber, Milz, Herz und Lungen der Kaninchen zerkleinert, mit gleichen Volumina n/20 HCl versetzt und die Aufschwemmung durch ein FOLLEY and WATSON blender gegeben. MATTICK und HIRSCH extrahierten das Nisin durch 5 Minuten langes Kochen des Breies in einem Wasserbad. Dann folgte die Trennung der festen Partikel von der im Verdünnungstest zu untersuchenden Flüssigkeit durch Zentrifugieren. Einer ähnlichen Methode der Nisin-Bestimmung unterlagen die s.c.-Injektionsstellen.

Alle inneren Organe enthielten Nisin. Die weitaus höchsten Konzentrationen fanden sich in den Lungen. Die s.c.-Injektionsstelle enthielt fast das gesamte verabreichte Nisin. Daraus erklärt sich die niedrige Toxizität des Nisins bei s.c.-Injektion.

Auf Leucozyten scheint das Nisin keinen Einfluß auszuüben (30). Die Wirkung von gereinigtem Nisin auf rote Blutzellen wurde von MATTICK und HIRSCH (22) nach einer Methode von RAMELKAMP und WEINSTEIN (38) erprobt. Es zeigte sich, daß Nisin selbst in den höchsten Konzentrationen nicht hämolysierend wirkt.

BERRIDGE konnte Nisin in Rinderblut bis 5 000 E/ml lösen und BAVIN (private Mitteilung) konstatierte eine Löslichkeit von 20 000 E/ml für Mäuseblut.

Die Nisinkonzentration im Blut nach einmaliger Injektion zeigt die Abbildung 3. Einen niedrigen Nisinspiegel fanden MATTICK und HIRSCH nach s.c.-Injektion. Dagegen i.v. appliziert steigt die Nisin-Konzentration im Blut für kurze Zeit auf recht hohe Werte an. Die i.m.-Nisingabe nimmt etwa eine Mittelstellung ein (22).

Ein gleichmäßig wirksamer Nisin-Blutspiegel bei Kaninchen konnte nach einer anfänglichen Sättigung (maximale Dosen in Abständen von 0, 1, 3, 8 und 19 Stunden) durch 12stündliche Injektionen erreicht werden (s. Abb. 4). Die Autoren (22) gingen davon aus, daß bei einer optimalen Therapie der Blutspiegel zwischen der maximal zulässigen Konzentration (nach BERRIDGE 5 000 E/ml) und der minimalen, gegen Mycobakterien noch wirksamen Dosis (100 E/ml) liegen muß. Einen Blutspiegel von 1 - 10 E/ml im Serum erhielt man bei Kaninchen durch Verfütterung von Nisin, das der Nahrung beigemischt war.

### 9. Wirkung des Nisins auf Infektionen

Die ersten Angaben über eine Nisinwirkung bei Infektionen finden wir bei MATTICK und HIRSCH (20). Je 10 mg eines stark verunreinigten Präparates wurden 20 Mäusen, die eine 10 000fache LD von mäu-

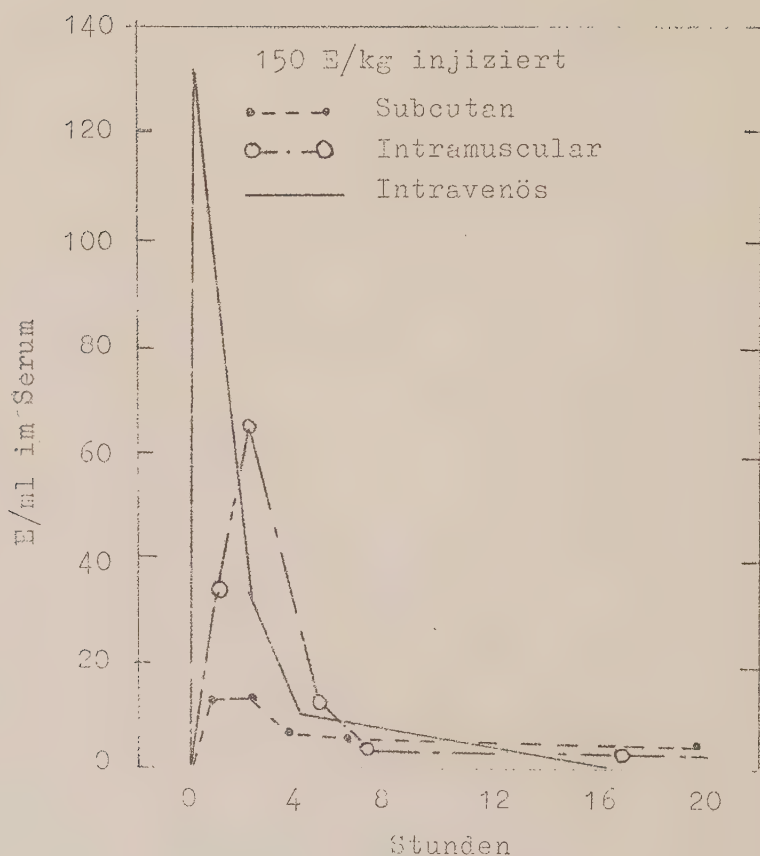


Abb. 3

Nisinkonzentration im Blut nach  
 einzelliger (s.c., i.m. und i.v.)  
 Injektion (NETTICH und HIRSCHE (22)).

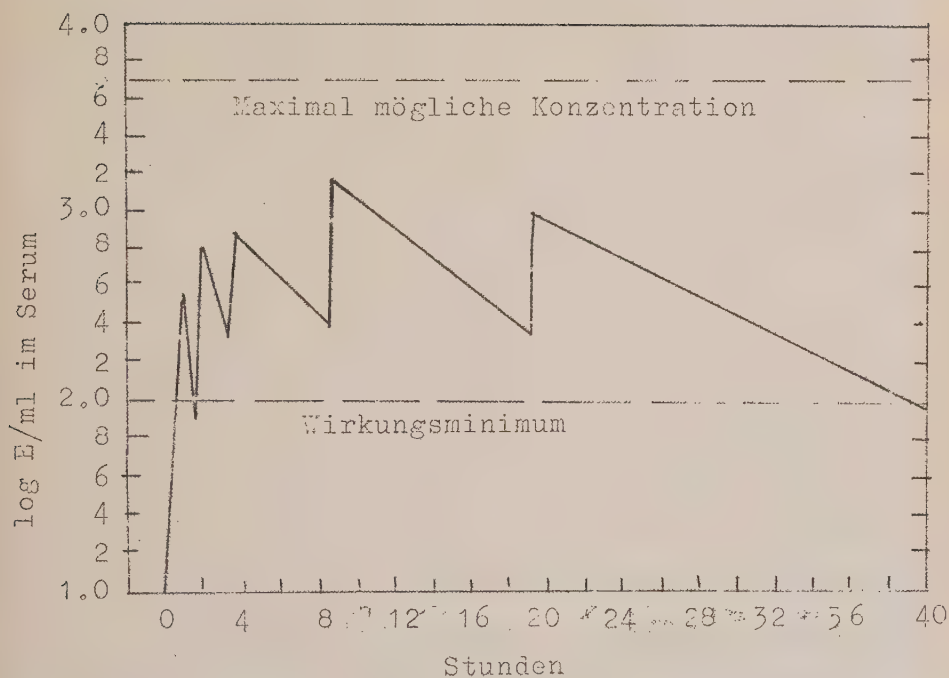


Abb. 4

Nisinkonzentration im Blut nach  
Injektionen in Abständen von 0,  
1, 3, 8 und 19 Stunden (KATTICK  
und HIRSCH (22)).

sepathogenen Streptokokken erhalten hatten, in 3-stündigem Abstand innerhalb von 45 Stunden appliziert. 40 % dieser Tiere lebten noch nach 7 Tagen, als der Versuch abgebrochen wurde. Bei Injektionen in 12stündigen Intervallen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Bei einem anderen Versuch erhielten die Mäuse die 1 000fache LD der og. Streptokokken. Nach 12 Stunden kränkelten die Tiere. Es wurde daraufhin eine einzige Dosis von 50 mg (100 000 E) der ungereinigten Substanz appliziert. Alle behandelten Mäuse lebten noch nach 10 Tagen, dagegen waren die Kontrolltiere innerhalb von 30 Stunden gestorben. Statt der Streptokokken wurde in einem weiteren Versuch *Clostridium septicum* als Infektionserreger verwendet. Bei gleichbleibender Versuchsanordnung überlebten 40 % der moribunden Tiere die Infektion. Ermutigende Ergebnisse wurden auch auf ähnliche Weise bei *Strept. pneumoniae* (Typ II) erzielt.

In 4 Tierversuchsserien testeten MATTICK und HIRSCH (22) die Wirksamkeit des Nisins an einer experimentell gesetzten Tuberkulose. Die näheren Zusammenhänge sind aus der Tabelle 4 ersichtlich. Während die Kontrolltiere eine generalisierte Tuberkulose aufwiesen, zeigten die behandelten Tiere makroskopisch keine Veränderung, mikroskopisch eine früher stattgefundene Tuberkulose. Die Autoren ziehen hieraus den Schluß, daß die s.c.-Injektion von Ni-

sin die Ausbreitung der Experimentaltuberkulose verhindert, i.v.-Gaben aber ihre Entwicklung beinahe vollständig unterdrücken (weitere Angaben bei BAVIN und BEACH (2)).

TAYLOR, HIRSCH und MATTICK (41) berichten, daß sie Nisin bei Euterinfektionen anwendeten, indem sie die Nisinlösung in die Milchkanäle (Ducti lactiferi) injizierten. Die Aufschwemmung von Nisin enthielt 2,5 bzw. 5 Mill. E Nisin in 1 ml. Zunächst wurde die reizende Wirkung des Nisins an gesunden Kühen getestet und an Krankheitssymptomen folgende Merkmale verwendet: Die Milchmenge, die physikalischen Daten der Milch, Gerinnungsanomalien, Vermehrung der Zellzahl der Milch, ein Auftreten von Temperatursteigerungen und Pulsfrequenzerhöhungen. Die ersten unreinen Präparate erwiesen sich als wenig verträglich. Es schien, als sei die Reizwirkung auf die Partikelgröße zurückzuführen, die bei  $200\mu^2$  lag. Diese Größe wurde deshalb auf  $10\mu^2$  reduziert. Daraufhin konnte eine schädigende Wirkung des Nisins nicht mehr festgestellt werden. 12 Stunden nach einer Infusion von 5 Mill. E/Milchkanal wurden 600 - 6 000 E/ml Nisin in der Milch nachgewiesen. Zunächst wurde das Nisin an 72 Kühen getestet, deren Euter mit Strept. agalactiae infiziert waren. Nach einer einzigen Infusion von 2,5 Mill. E je Milchkanal waren von 35 Kühen nach 21 Tagen 30 (86 %) geheilt. Ein noch besseres Ergebnis wurde

mit einer Infusion von 5 Mill. E Nisin erzielt: Von 37 Kühen zeigten jetzt 35 (95 %) nach 21 Tagen im bakteriologischen Test keine Bakterien. Ähnlich gute Erfolge wurden in der Behandlung von Staphylokokkeninfektionen gesehen: Von 3 Kühen wurden 2 nach einer Gabe von 2,5 Mill. E geheilt. Nach einer Infusion von 5 Mill. E in die Milchkanäle wurden sogar 9 von 10 Tieren infektionsfrei. 2 Kühe, die eine Strept.-dysagalactiae-Mastitis aufwiesen, reagierten auf 2,5 Mill. E Nisin nicht. Dieses Ergebnis war vor auszusehen, da der Stamm in vitro gegenüber Nisin unempfindlich ist. In allen Fällen zeigten die Kontrolltiere keine Besserung der Symptome. Der Erfolg des Nisins bei den geheilten Mastitiden wird auf die hohe Bakterizidie und auf die große Oberflächenaktivität des Nisins zurückgeführt.

#### 10. Anwendung des Nisins

Sporenbildende Anaerobier (Clostridien) sind praktisch ubiquitär (6; 28). Z.B. Enthielten 92 % des von HOOD und SMITH untersuchten Cheddar-Käses gasbildende Clostridien. Jedoch entwickeln sich diese Bazillen in gutem Käse nicht, da u.a. der Säure- und Salzgehalt sehr hoch ist. Gegensätzlich verhält sich süßer Käse der Schweizerart, z.B. Emmenthaler und Gruyère, in dem die gasbildenden Sporen sich leicht entwickeln können und den Käse für den menschlichen Genuß unbrauchbar machen. Der norma-

lerweise flache Käse dehnt sich durch die Gasbildung aus. 1949 beobachtete MATTICK, daß Nisin das Wachstum der Clostridien hemmt und das Aufblühen von Gruyère und ähnlichen Käsesorten verhindert. Außerdem gelang es (21), einen haltbaren Käse, der stark mit Clostridien verunreinigt war, zu produzieren, wenn man der zu verkäsenden Milch einen nisinbildenden Streptokokkenstamm zusetzte. Dagegen blühte sich Käse, der ohne den Zusatz der nisin-bildenden Streptokokkenkultur bereitet wurde, innerhalb von 3 Wochen auf. Bei diesen Versuchen wurde keine nachteilige Aromabildung festgestellt, da die thermophilen Streptokokken und die propionsäure-bildenden Bakterien, die den charakteristischen Schweizer-Käse-Geschmack verursachen, nicht durch das sich bildende Nisin in ihrem Wachstum behindert werden. Mc CLINTOCK u.a.

(31) untersuchten ebenfalls die Wirkung des Nisins am Gruyère und stellten fest, daß 50 E Nisin/g Käse die Blähungen verhindern. Um gute Resultate zu erzielen, sollte man jedoch 100 E Nisin/g Käse anstreben. Die Nisinkonzentration im Käse nimmt jedoch nach einiger Zeit ab, so daß sich diejenigen Sporen, die nur gehemmt und nicht abgetötet sind, noch nach Wochen entwickeln können.

Weitere Untersuchungen über die Verwendungsmöglichkeiten von Nisin und Nisinkulturen wurden am bakteriologischen Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft unternommen

|   | Verwendete<br>Tierarten   | Zahl der<br>Tiere | Bakterien-<br>stamm | Infektions-<br>weg | Einsetzen<br>d. Behandl.<br>nach Stunden | Applikation<br>des Nisins | Dosierung                        |
|---|---------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
|   |                           |                   |                     |                    |                                          |                           | Inter-<br>vall<br>E/kg<br>je Tag |
| 1 | Meer-<br>schwein-<br>chen | 8                 | C                   | subcut.            | 12                                       | subcut.                   | 6stündlich<br>720 000            |
| 2 | "                         | 8                 | C                   | "                  | 12                                       | "                         | 6stündlich<br>1 200 000          |
| 3 | "                         | 8                 | C                   | "                  | 12                                       | "                         | 6stündlich<br>1 200 000          |
| 4 | Kanin-<br>chen            | 6                 | AM<br>5             | intraven.          | 12                                       | in-<br>traven.            | 8stündlich<br>1 700 000          |

Tab. 4

Die Wirksamkeit von Nisin bei einer experimentell

| Dauer                                       |                              | Begleiter-<br>scheinungen                                            |                 | Ergebnisse                                                                                     |                                                                                           |
|---------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| der Fe-<br>der handl.<br>des versu-<br>ches | handl.<br>des versu-<br>ches | lokale                                                               | allge-<br>meine | Kontroll-<br>tiere                                                                             | behandelte<br>Tiere                                                                       |
| 4 Wochen                                    | 8 Wochen                     | ausgepräg-<br>te Reaktion<br>(Ödem, ge-<br>folgt von<br>Nekrose)     | kei-<br>ne      | stark infi-<br>ziert, tie-<br>ferliegen-<br>de Lymph-<br>knoten, Milz<br>und Leber<br>befallen | Ausbreitung<br>u. Schwere-<br>der Infek-<br>tion gerin-<br>ger, Leber<br>und Milz<br>frei |
| 4 Wochen                                    | 8 Wochen                     | Wie Ver-<br>such 1,<br>jedoch<br>weniger<br>stark<br>ausge-<br>prägt | kei-<br>ne      | Wie Ver-<br>such 1                                                                             | Wie Ver-<br>such 1                                                                        |
| 4 Wochen                                    | 8 Wochen                     | Wie Ver-<br>such 2                                                   | kei-<br>ne      | Wie Ver-<br>such 2,<br>zusätz-<br>lich Lun-<br>gen be-<br>fallen                               | Wie Ver-<br>such 2,<br>jedoch Lun-<br>gen befal-<br>len                                   |
| 5 Tage                                      | 12 Wochen                    | Gering,<br>Venen<br>etwas<br>verhär-<br>tet                          | kei-<br>ne      | Generali-<br>sierte Tbc<br>der Lungen,<br>der Milz,<br>der Einge-<br>weide usw.                | Makrosko-<br>pisch keine,<br>histolog.<br>eine abge-<br>heilte Tbc                        |

Tab. 4

Herzeugten Tuberculose (HIRSCH und MATTICK (22)).

(26). DEMETER empfiehlt, eine Mischkultur verschiedener nisinbildender Streptokokkenstämme zur Beimpfung der Milch zu verwenden, um die störende Wirkung verschiedener nisinase-bildender Bakterien, z.B. *Streptobacterium plantarium* (25; 3), auszuschalten. Auch KUNDRAT berichtet (26), daß vor allem in der Schmelzkäserei gute Erfahrungen mit nisinbildenden Kulturen gemacht wurden, da diese die Gasbildung durch Buttersäurebazillen und Betakokken verhindern.

Eine englische Firma APLIN & BARETT vertreibt einen Magermilchkäse "Nisaplin", der 10 000 E Nisin je g Käse enthält. Das Nisaplin setzt man dem Schmelzgut zu 1 - 2 % zu und verhindert dadurch weitgehend das Aufblähen. Während des Schmelzprozesses werden jedoch bei 90° C und einem pH von 6,2 ungefähr 10 % des Nisins zerstört. Trotz der Vorteile, die ein Nisinzusatz bei der Konservierung des Käses bietet, bleibt manche dennoch auftretende Blähung ungeklärt. Auch hier muß man an verschiedene ungeklärte Faktoren bei der Aktivierung der Sporen denken und die steigende Resistenz gegenüber Nisin mit in Betracht ziehen.

## II. Teil

### EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 11. Diffusionstest

Allgemein wird im Untersuchungsbereich der Kliniken die Antibioticawirkung durch den Diffusionstest beurteilt. Er stellt eine praktische und leicht vergleichbare Untersuchungsmethode dar. Das regte uns dazu an, die ungünstige Beurteilung, die der Lochtest hinsichtlich seiner Anwendbarkeit auf Nisin erfahren hatte, nachzuprüfen und gegebenenfalls eine ähnliche Methode zu entwickeln.

#### Methodik:

Auf die 3 - 4 mm dicke Nähragarschicht wurde die zu untersuchende Bakterienart aus einer 24-Stunden-Kultur mit der Platinöse aufgetragen. Das ausgestanzte Agarloch der Petrischale erhielt 0,1 bzw. 0,3 ml einer wässrigen Nisinlösung mit einer aus der Tabelle ersichtlichen Einheitenzahl. Die Platten wurden bei 37° C im Brutschrank gelagert und nach 24 und 48 Stunden die Wachstums- hemmung abgelesen.

Das im dritten Versuch verwendete Tween 80 wurde zu 1 % in sterilem Aqua dest. gelöst, 5 Minuten aufgekocht und dann als Lösungsmittel des Nisins benutzt.

|                       | Nisinkonzentration |       |      |      |     |       |        |
|-----------------------|--------------------|-------|------|------|-----|-------|--------|
|                       | 300 E              | 100 E | 50 E | 10 E | 5 E | 2,5 E | 1,25 E |
| Staph. albus          | 0,7                | 0,4   | 0,3  | 0,3  | +   | +     | +      |
| Staph. aureus Sg 511  | 0,5                | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Staph. aureus resist. | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Strept. virid.        | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Strept. haemol.       | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Strept. faecal.       | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| E.coli                | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Ps. aerug.            | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Coryne bakt.          | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |
| Bac. subtil.          | 0,4                | 0,2   | +    | +    | +   | +     | +      |
| Bac. mesent.          | 0,2                | 0,1   | +    | +    | +   | +     | +      |
| Bac. prot.            | +                  | +     | +    | +    | +   | +     | +      |

Tab. 5

Lochtest mit einem Agar von pH 6 und 0,1 ml Nisinlösung  
 Zeichenerklärung: Zahl = Hemmhof in cm  
 + = normales Wachstum

| Tween                       | Nisinkonzentration |       |             |      |             |        |             |
|-----------------------------|--------------------|-------|-------------|------|-------------|--------|-------------|
|                             | 80                 | 100 E | 100 E       | 25 E | 25 E        | 12,5 E | 12,5 E      |
|                             | Tween<br>80        |       | Tween<br>80 |      | Tween<br>80 |        | Tween<br>80 |
| Staph.<br>aureus<br>3g 511  | 0,15               | 0,15  | +           | +    | +           | +      |             |
| Staph.<br>aureus<br>resist. | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Strept.<br>virid            | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Strept.<br>haem.            | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Coryne<br>Bakt.             | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Bac.<br>subtil-             | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Bac.<br>mesent.             | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |
| Hefe<br>Rasse D             | +                  | +     | +           | +    | +           | +      |             |

Tab. 6

Lochtest zum Nachweis des Einflusses von Tween 80  
 Das Tween 80 wurde der Nisinlösung zu 1 % zugesetzt.  
 Zum Test wurden jeweils 0,3 ml Nisinlösung und ein  
 pH-6-Agar Nährboden verwandt.

Zeichenerklärung: Zahl = Hemmhof in cm  
 + = normales Wachstum

Der erste Versuch wurde mit einem Agarnährboden von pH 7,2 durchgeführt. Es zeigte sich keine Hemmung des Bakterienwachstums bei den verwendeten Nisin-konzentrationen von 300, 100, 50, 10, 5, 2,5 und 1,25 E. Als Testkeime dienten: Staph. albus, Staph. aureus, penicillinresistenter Staph. aureus, Strept. haem. der Gruppe A, Strept. faecalis (D), E. coli, Pseudom. aeruginosa, Corynebact. diphtheriae, Bact. proteus, Bac. subtilis und mesentericus.

#### Methodik:

Aufgrund der schneller auftretenden Inaktivierung von Nisin bei einem pH-Wert von 7,2 wurde im zweiten Versuch (s. Tab. 5) der Agarnährboden mit Hilfe von pH-Indikatorpapier und konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Die sonstige Auswahl der Testkeime behielten wir bei.

Eine hemmende Wirkung des Nisins auf das Bakterienwachstum stellte sich bei einem pH-6-Agarnährboden im Lochtest nur bei sehr hohen Nisinkonzentrationen (300 E) bei Staph. albus, Staph. aureus Sg 511, Bac. subtilis und mesentericus ein. Andererseits bildete sich bei empfindlichen Bakterienarten, z.B. Streptokokken, selbst bei diesen hohen Konzentrationen kein Hemmungshof aus (s. Tab. 5).

Im dritten Versuch (s. Tab. 6) wurde Tween 80 der Nisinlösung zugegeben. Es sollte die Haftung des oberflächenaktiven Nisins an der Petrischale herabsetzen und nach BEACH (3) die Diffusionsgeschwindigkeit des Nisins in Agar erhöhen. Doch zeigte Tween 80

keine Verstärkung der hemmenden Wirkung des Nisins. Die schwache Wirkung des Nisins auf das Bakterienwachstum im Lechttest könnte durch die von BERRIDGE (s. 3. 13, I. Teil) bestimmte Molekulargröße und daraus resultierende geringe Diffusionsfreudigkeit des Nisins erklärt werden.

## 12. Verdünnungstest

Als geeignetere Untersuchungsmethode zum Nachweis der Nisinwirkung bot sich uns der Verdünnungstest an. In Abwandlung der bei MATTICK und HIRSCH (30) beschriebenen Untersuchungstechnik verwandten wir folgende Versuchsanordnung.

### Methodik:

Da Nisin bei pH 7,2 inaktiviert wird, wurde eine Traubenzucker-Bouillon mit Hilfe von konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 4,3 und beim zweiten Versuch auf pH 6 eingestellt. Das Nisin wurde in verschiedenen Mengen dieser Traubenzucker-Bouillon zugesetzt und jedes Untersuchungsröhrchen mit 1 ml Nisin-Traubenzucker-Bouillon gefüllt. Die Beimpfung der Röhrchen erfolgte mittels 0,1 ml einer 1:100 (bzw. 1:50) verdünnten, 18 (bzw. 7) Stunden bebrüteten Nährbouillon. Nach 24 und 48 Stunden wurde das Ergebnis abgelesen. Nur ein Bakterienwachstum trübte die anfangs klare Bouillon, eine daraufhin angelegte Subkultur zeigte, ob ein vollständiger Zelltod eingetreten war. Der zweite Versuch wurde, um einen Zufall auszuschließen, im fünffachen Ansatz durchgeführt.

Im ersten Verdünnungstest (s. Tab. 7) sehen wir eine Behinderung des Bakterienwachstums infolge des niederen pH-Wertes von 4,3. Die Wachstumshemmung trat

| Testkeime |   | Einheiten Nisin/ml |      |     |   |    |    | Kontr. |
|-----------|---|--------------------|------|-----|---|----|----|--------|
|           |   | 0,625              | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 20 |        |
| Staph.    | A | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
| albus     | B | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
|           | C | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
| Staph.    | A | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| aureus    | B | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| resist.   | C | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| Staph.    | A | +                  | +    | +   | Ø | Ø  | Ø  | +      |
| aureus    | B | +                  | +    | +   | + | Ø  | Ø  | +      |
| 3g 511    | C | +                  | +    | +   | + | Ø  | Ø  | +      |
| Haem.     | A | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
| Strept.   | B | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
|           | C | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
| Bac.      | A | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| subtilis  | B | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
|           | C | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| Bac.      | A | +                  | +    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | +      |
| mesent.   | B | +                  | +    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | +      |
|           | C | +                  | +    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | +      |
| E. coli   | A | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
|           | B | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
|           | C | Ø                  | Ø    | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø      |
| Ps.       | A | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| aerugi-   | B | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |
| nosa      | C | +                  | +    | +   | + | +  | +  | +      |

Tab. 7

Nisinempfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen  
in einer pH-4,3-Bouillon

Zeichenerklärung für Tab. 7 und 8:

A=Direktablesung d. Wachstums n. 24 Std. Bebrütung  
(Bakteriostase)

B=Direktablesung d. Wachstums n. 48 Std. Bebrütung  
(Baktericidie)

C=Ergebnis der nach 48 Std. angelegten Subkultur

+ = Wachstum der Bakterien Ø = kein Wachstum

| Testkeime           |   | Einheiten Nisin, ml |     |   |    |    |     |     |
|---------------------|---|---------------------|-----|---|----|----|-----|-----|
|                     |   | 1,25                | 2,5 | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 |
| Staph.<br>albus     | A | Ø                   | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
| Staph.<br>aureus    | A | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
| resist.<br>Staph.   | A | +                   | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
| Sg 511<br>Haem.     | A | +                   | Ø   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
| Strept.             | A | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
| Strept.<br>faecalis | A | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
| Loryn.<br>iphth.    | A | +                   | +   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | Ø  | Ø   | Ø   |
| Bac. sub-<br>tilis  | A | +                   | +   | Ø | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | Ø   |
| Bac.<br>mesent.     | A | +                   | +   | + | Ø  | Ø  | Ø   | Ø   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | Ø   | Ø   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | Ø   |
| E. coli             | A | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
| Ps.aeru-<br>ginosa  | A | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
| Bact.<br>proteus    | A | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | B | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |
|                     | C | +                   | +   | + | +  | +  | +   | +   |

Tab. 8

Nisinempfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen in  
einer pH-6-Traubenzuckerbouillon

bei *Staph. aureus* Sg 511 bei 10 E/ml auf. *Staph. albus*, *Strept. haem.*, *Bac. subtilis* und *E. coli* wuchsen in diesem Milieu nicht. Der penicillinresistente *Staph. aureus*, auch *Strept. faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa* sprachen auf die Nisingaben nicht an. Im zweiten Verdünnungsversuch (s. Tab. 8) läßt sich die Hemmung auf das anwesende Nisin zurückführen. Man muß folgern, daß bei einem pH-Wert von 6 das günstigste Milieu geboten wird, denn einerseits ist das Bakterienwachstum durch die nur leichte Säuerung noch ungehindert, andererseits bleibt das Nisin in aktiver Form längere Zeit in der Bouillon erhalten. Die Grenzwerte, bei denen eine Hemmung noch zu finden war, sind in der Tabelle 9 enthalten. Eine Beeinflussung des Wachstums sehen wir bei *Staph. albus*, *Staph. aureus* Sg 511, *Strept. haem.* der Gruppe A sowie bei *Bac. subtilis* und *mesentericus*. Der penicillinresistente *Staph. aureus* und der *Strept. faecalis* zeigten in den untersuchten Konzentrationsbereichen keine Hemmung ihres Wachstums. Die gramnegativen Keime *E. coli*, *Ps. aeruginosa* und *Bact. proteus* sprachen, wie erwartet, auf Nisin nicht an. Diese Ergebnisse stehen in ungefährtem Einklang mit den auf Seite 20 wiedergegebenen Wirkungen des Nisins auf Bakterien, wie sie von HIRSCH und MATTICK beschrieben worden sind.

| Stamm             | Bacteriostase<br>E/ml Nisin | Bactericidie<br>E/ml Nisin |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Staphyl. albus    | 1,25                        | 5                          |
| Staphyl. aur.     |                             |                            |
| Sg 511            | 2,5                         | 5                          |
| Strept. haemol.   | 5                           | 100                        |
| Bac. subtilis     | 10                          | 100                        |
| Bac. mesentericus | 10                          | 200                        |

Tab. 9

Nisinempfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen (übersichtlicher angeordnet).

### 13. WARBURG-Versuche

Interessant erschien es uns, die Einwirkung von Nisin auf bestimmte Wachstumsphasen von Staph. aureus Sg 511 zu untersuchen. Weiterhin ließ sich vielleicht mit Stoffwechseluntersuchungen klären, ob Nisin eine Wirkung auf E. coli besitzt. Zur Kontrolle des Stoffwechsels wurde die mikromanometrische Meßmethode nach WARBURG (32; 33) verwendet.

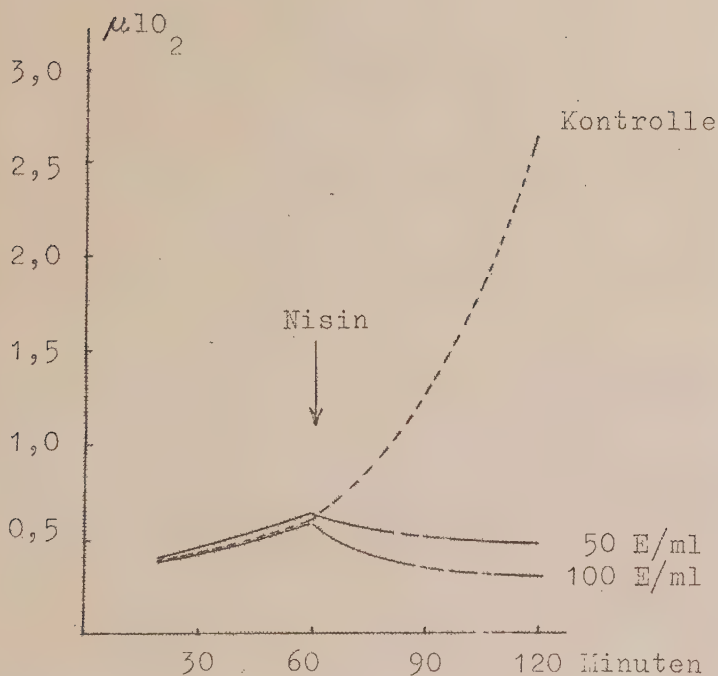
#### Methodik:

Die 25 ml fassenden WARBURG-Kölbchen wurden mit 3,5 ml pH-6-Bouillon gefüllt und im ersten Versuch mit 1 ml 1:4 verdünnter und in sämtlichen folgenden Versuchen mit 1 ml 1:2 verdünnter 24-stündiger Staph. aureus Sg 511 Bouillon bzw. Coli-Bouillon beimpft. In einem besonderen Behälter innerhalb des Kölbchens wurde das gebil-

| abgelesen<br>nach                             | 20'  | 40'  | 60'  | Zugabe<br>von           | 80'  | 100' | 120' | 140' | 160' | 180'  |
|-----------------------------------------------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| O <sub>2</sub> -<br>Verbr.<br>in<br>μl/10 min | 0,39 | 0,46 | 0,61 | 100 E/ml<br>Nisin       | 0,39 | 0,35 | 0,31 | 0,28 | 0,26 | 0,26  |
|                                               | 0,41 | 0,50 | 0,65 | 50 E/ml<br>Nisin        | 0,54 | 0,49 | 0,48 | 0,37 | 0,42 | 0,32  |
|                                               | 0,38 | 0,48 | 0,67 | Kontrolle<br>phys. NaCl | 0,92 | 1,89 | 2,64 | 4,89 | 7,06 | 11,24 |

Tab. 10 und Abb. 5:

I. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 am Ende der lagphase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Tab. 10 und Abb. 5:

I. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 am Ende der lag-phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

detes  $\text{CO}_2$  durch NaOH adsorbiert. Nach Erwärmen auf  $37^\circ \text{C}$  in einem Wasserbad wurde durch die automatische Schüttelvorrichtung bei einer Frequenz von 120 Ausschlägen in der Minute, bei gleichbleibender Temperatur, ein unter gleichen Bedingungen verlaufender Stoffwechsel erzielt. In einem besonderen Ansatzstutzen deponierten wir 0,5 ml der Nisinlösung bzw. bei den Kontrollen die gleiche Menge Aqua dest. Zu einem gewünschten Zeitpunkt konnte ohne Öffnung des Systems durch Kippen der gesamten Apparatur die Nisinlösung dem Medium zugegeben werden, so daß sich jetzt Konzentrationen von 50, 100, 200 oder 300 E/ml Nisin in der Nährbouillon befanden. Die Kontrollen erhielten zum gleichen Zeitpunkt 0,5 ml Aqua dest.

Die Tabellen und graphischen Abbildungen zeigen, daß im ersten Versuch (s. Tab. 10 und Abb. 5) das Nisin am Ende der sog. lag-phase, bei Versuch 2 (s. Tab. 11 und Abb. 6) während der Wachstumsphase und im dritten Versuch (s. Tab. 12 und Abb. 7) zum Zeitpunkt des maximalen Stoffwechsels zugegeben worden ist. Am Ende der lag-phase reagierte der Bakterien-Stoffwechsel schon bei Nisinkonzentrationen von 50 und 100 E/ml sehr empfindlich. Man sieht bei diesem Versuch eine Parallelität der Stoffwechselkurven bei leichtem Rückgang des Sauerstoffverbrauchs, während die Kontrollen einen schnell ansteigenden Stoffwechselzuwachs zeigen. Im zweiten Versuch verursachten 50 E/ml Nisin, in der Wachstumsphase zugegeben, nur eine leichte Hemmung des Bakterienstoffwechsels, eine Bakteriostase. Auch der Stoffwechsel bei der Nisinkonzentration von 100 E/ml bleibt nach der Nisinzugabe noch in diesem bakteriostatischen

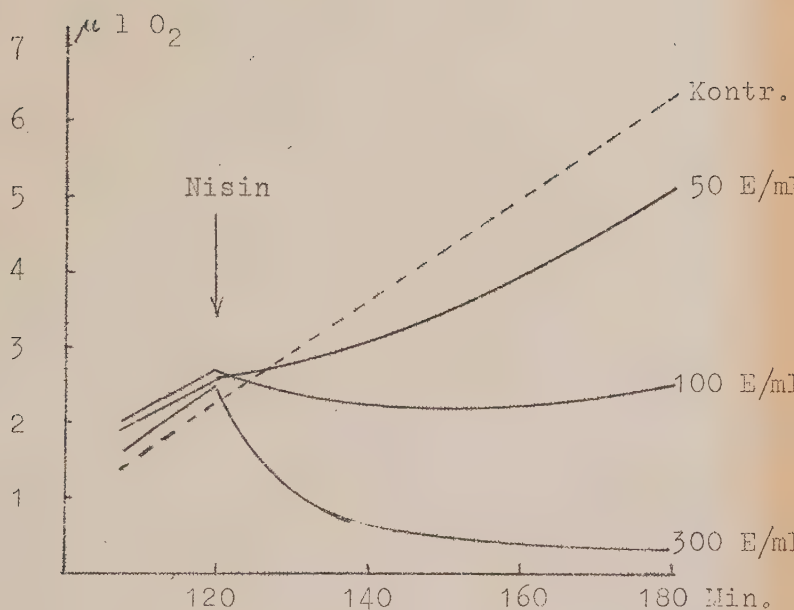
Bereich. Dagegen sehen wir bei einer Nisinkonzentration von 300 E/ml nach etwa 20 Minuten ein fast vollständiges Versiegen des Stoffwechsels, eine Bakterizidie. Der dritte Versuch zeigt, daß selbst bei maximaler Keimzahl, die sich in dem maximalen Stoffwechsel zu erkennen gibt, eine bakteriostatische Wirkung des Nisins noch im Bereich von 50 E/ml zu erwarten ist. Der Stoffwechsel sinkt bei dieser Nisinkonzentration noch schneller auf niedrigere Werte herab als bei den Kontrollen. Höhere Nisinkonzentrationen (200 und 300 E/ml) wirken auf die untersuchten Keime bakterizid. Schon nach 30 Minuten ist bei diesen Nisindosen ein Stoffwechsel kaum noch nachweisbar. An Hand dieser Stoffwechseluntersuchungen lassen sich die Angaben von HIRSCH (s. S. 20, I. Teil) z.T. bestätigen. Es scheint uns jedoch unwahrscheinlich, daß es in den ersten Minuten nach der Nisinzugabe schon zu so hochgradigen Veränderungen, zu einer so schnell einsetzenden Bakterizidie kommt, wie sie HIRSCH feststellen konnte. Eine eindeutige bakterizide Wirkung des Nisins trat in unseren Versuchen bei sehr hohen Dosen frühestens nach 20 - 30 Minuten auf.

Der E. coli-Versuch, der mit Nisinkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400 und 500 E/ml in einer pH-6-Bouillon ausgeführt wurde, zeigte auch in WARBURG-Apparat keine Beeinflussung des Bakterienwachstums.

| abgelesen<br>nach              | 110' | 120' | Zugabe<br>von           | 130' | 140' | 150' | 160' | 170' | 180' |
|--------------------------------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                | 1,84 | 2,50 | 300 E/ml<br>Nisin       | 0,87 | 0,56 | 0,33 | 0,32 | 0,28 | 0,17 |
| O <sub>2</sub> -Ver-<br>brauch | 2,03 | 2,71 | 100 E/ml<br>Nisin       | 2,24 | 1,73 | 2,03 | 2,42 | 2,54 | 2,51 |
| in<br>10<br>min                | 2,02 | 2,65 | 50 E/ml<br>Nisin        | 2,37 | 2,49 | 3,74 | 3,90 | 4,40 | 4,32 |
|                                | 1,69 | 2,36 | Kontrolle<br>phys. NaCl | 2,52 | 2,58 | 4,10 | 4,87 | 6,12 | 5,86 |

Tab. 11 und Abb. 6:

II. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 in der Wachstumsphase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Tab. 11 und Abb. 6:

II. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 in der Wachstumsphase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

14. Abnahme der Nisinkonzentration in einer Bouillon  
 Zur richtigen Beurteilung des Verdünnungstestes ist es von Bedeutung, ob eine Nisin enthaltende Bouillon ihre Nisinkonzentration über längere Zeit aufrecht erhält oder mit einem baldigen Abfall zu rechnen ist.  
 Methodik:

Eine Nisinlösung von 30 000 E/ml wurde durch Lösen der Nisintrockensubstanz in einer n/500 HCl hergestellt. Nach der Sterilisation in einem Wasserbad wurde die Lösung mit der gleichen Menge n/300 NaOH neutralisiert. Diese Nisinlösung von 15 000 E/ml ergab mit einer pH-6-Bouillon gemischt die Ausgangslösung mit einer Nisinkonzentration von 1 000 E/ml. Ein Teil davon wurde über 10 Tage im Brutraum bei 37° C, ein anderer Teil im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Täglich entnommene Proben wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit pH-6-Bouillon auf ihre Hemmkraft gegenüber Staph. aureus Sg 511 getestet.

Eine Abnahme der Nisinkonzentration sahen wir bei der Nisin-Bouillon, die bei 4° C aufbewahrt worden war, innerhalb der 10 Untersuchungstage nicht (s. Tab. 13). Dagegen zeigte sich bei einer 37° C-Bouillon, daß die hemmende Kraft des Nisins nach 3 Tagen um eine Stufe der Verdünnungsreihe abnahm. Eine genauere Festlegung ist jedoch nur durch eine subtilere Untersuchungstechnik möglich.

#### 15. Resistenzsteigerungen von Bakterien nach subletalen Dosen von Nisin

Für die klinische Behandlung von bakteriellen Infektionen ist es von größter Bedeutung, ob eine gleich-

mäßige Ansprechbarkeit der Bakterien auf das Antibiotikum zu erwarten ist oder ob nach einiger Zeit durch Mutation oder Selektion eine Resistenz gegenüber den üblichen Antibiotikadosen eintritt. Zur Feststellung einer Resistenzsteigerung verwendeten wir 3 Bakterienarten, die sich im Verdünnungstest als sehr empfindlich gegenüber Nisin gezeigt hatten: Staph. aureus Sg 511, Strept. haem. der Gruppe A und Bac. subtilis.

#### Methodik:

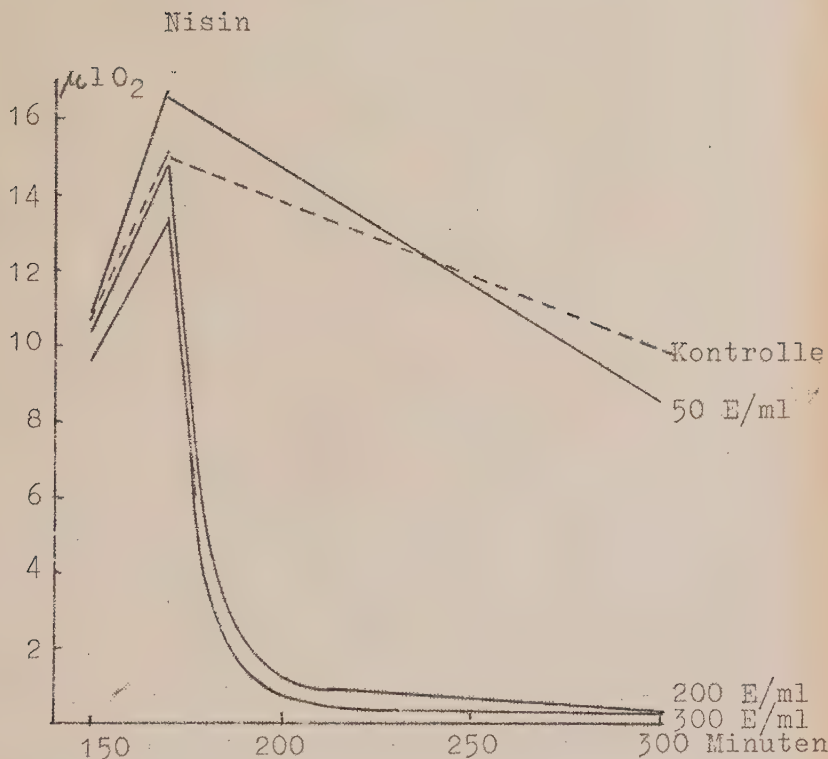
Die 20 000 E/ml enthaltende Nisinlösung wurde mit einer n/300 HCl hergestellt und durch 20 Minuten langes Kochen im Wasserbad sterilisiert. Nach der Neutralisation mit NaOH stellten wir eine arithmetische Verdünnungsreihe mit Hilfe einer pH-6-Bouillon her. Die Untersuchungsröhrchen enthielten 1 ml Nisinbouillon und wurden dann mit der Platinöse aus einer 24-Stunden-Kultur der entsprechenden Bakterienart inoculiert. Wir überimpften täglich aus den noch gerade bewachsenen Untersuchungsröhrchen auf eine neue Untersuchungsreihe, die, entsprechend der Resistenzzunahme, immer höhere Dosen von Nisin enthielt. In der Zwischenzeit wurden die Röhrchen bei  $57^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Jeden 2. - 3. Tag wurde durch eine Subkultur die Reinheit des gewachsenen Stammes festgestellt.

Aus Tabelle 14 ist ersichtlich, daß eine gesteigerte Resistenz der 3 untersuchten Bakterienarten nach subletalen Dosen von Nisin eintritt. So muß die Nisinkonzentration, um gerade noch eine Hemmung zu bewirken, in der ersten Woche bei Staph. aureus Sg 511 um das 24fache steigen, bei Bac. subtilis um das 25fache zunehmen und bei Strept. haem. benötigt man das 50fache der Ausgangskonzentration. Uns interes-

| abgel.<br>nach       | 140' | 150' | 160' | 170' | Zugabe<br>von     | 180' | 190' | 200' | 220' | 240' | 260' | 280' | 300' |
|----------------------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| O <sub>2</sub> -     | 7,1  | 9,8  | 12,1 | 13,4 | 300 E/ml<br>Nisin | 3,1  | 1,5  | 0,5  | 0,6  | 0,1  | 0,2  | 0,1  | 0,1  |
| Ver-<br>brauch<br>in | 7,3  | 10,3 | 13,2 | 15,1 | 200 E/ml<br>Nisin | 4,4  | 1,9  | 0,9  | 1,0  | 0,6  | 0,7  | 0,3  | 0,3  |
| ,l/10<br>min         | 7,4  | 10,7 | 14,8 | 16,7 | 50 E/ml<br>Nisin  | 15,7 | 15,1 | 14,1 | 12,2 | 12,8 | 11,0 | 9,1  | 8,6  |
|                      | 8,3  | 10,6 | 14,1 | 15,2 | Kontrolle         | 14,3 | 13,9 | 14,1 | 14,2 | 13,1 | 12,6 | 10,6 | 10,1 |

Tab. 12 und Abb. 7:

III. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 zum Zeitpunkt der maximalen Keimzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Tab. 12 und  
Abb. 7:

III. WARBURG-Versuch. Die Einwirkung von Nisin auf den Sauerstoffverbrauch des Staphyl. aur. Sg 511 zum Zeitpunkt der maximalen Keimzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

| Tag | 4° C  | 37° C |
|-----|-------|-------|
| 1   | 1:256 | 1:256 |
| 2   | 1:256 | 1:256 |
| 3   | 1:256 | 1:128 |
| 4   | 1:256 | 1:128 |
| 5   | 1:256 | 1:128 |
| 6   | 1:256 | 1:128 |
| 7   | 1:256 | 1:128 |
| 8   | 1:256 | 1:128 |
| 9   | 1:256 | 1:128 |
| 10  | 1:256 | 1:128 |

Tab. 13

Die oben aufgeführten Werte der Verdünnungsstufen einer pH-6-Nisin-Bouillon, deren Ausgangskonzentration 1 000 E/ml betrug, geben die Wachstumsgrenze des Staph. aureus Sg 511 wieder. Die Nisin-Bouillon wurde bei 4° C bzw. 37° C 10 Tage lang aufbewahrt.

sierte, ob diese steigende Unempfindlichkeit gegenüber Nisin bald einem Grenzwert zustrebte. Zur Feststellung verwendeten wir den relativ sensiblen Staph. aureus Sg 511 und sahen, daß er bei weiteren subletalen Dosen von Nisin sich fortlaufend an höhere Nisinkonzentrationen adaptierte. Nach 17 Tagen gelang dem Staphylococcus ein Wachstum bei 2 000 E/ml. Der Versuch wurde abgebrochen, da eine weitere Resistenzsteigerung vom praktischen Gesichtspunkt uninteressant schien.

## Wachstum bei E/ml Nisin

| Staph. aur.<br>Sg 511 | Strept.<br>haem. | Bacillus<br>subtilis |
|-----------------------|------------------|----------------------|
|-----------------------|------------------|----------------------|

| Ausgangswert | 1,25   | 1,25  | 2,5   |
|--------------|--------|-------|-------|
| 1. Passage   | 2,5    | 2,5   | 10,0  |
| 2. "         | 5,0    | 10,0  | 40,0  |
| 3. "         | 10,0   | 20,0  | 50,0  |
| 4. "         | 20,0   | 40,0  | 70,0  |
| 5. "         | 25,0   | 70,0  | 100,0 |
| 6. "         | 60,0   | 80,0  | 200,0 |
| 7. "         | 90,0   | 125,0 | 250,0 |
| 8. "         | 200,0  | 175,0 | 300,0 |
| 9. "         | 400,0  |       |       |
| 10. "        | 450,0  |       |       |
| 11. "        | 550,0  |       |       |
| 12. "        | 700,0  |       |       |
| 13. "        | 800,0  |       |       |
| 14. "        | 1000,0 |       |       |
| 15. "        | 1200,0 |       |       |
| 16. "        | 1600,0 |       |       |
| 17. "        | 2000,0 |       |       |

Tab. 14

Resistenzsteigerung nach subletalen Nisingsaben

## 16. Das Verhalten nisinresistenter Staphylokokken gegenüber anderen Antibiotika

Für eine therapeutische Anwendung von Nisin ist es wichtig zu wissen, ob eine Nisinresistenz von Bakterien, die sich durch eine längere Behandlung mit Nisin entwickeln kann, auch eine Resistenz gegenüber anderen Antibiotika zur Folge hat.

### Methodik:

Zur Festung nisinresistenter Staphylokokken wurden im doppelten Ansatz geometrische Verdünnungsreihen von Tetracyclin und Terramycin (10 - 0,009  $\mu$ /ml), von Mycipen (2,5 - 0,002  $\mu$ /ml), von Streptomycin (50 - 0,045  $\mu$ /ml) und Penicillin (2,5 - 0,001 E/ml) hergestellt. Mit 0,1 ml einer 1:100 verdünnten 24stündigen Bouillon von Staphylokokken, die noch bei einer Nisinkonzentration von 2 000 E/ml wachsen konnten, wurden die Verdünnungsreihen beimpft. Nach einem 24stündigen Aufenthalt der Teströhrchen im Brutraum bei 37° C lassen wir das Ergebnis ab.

Die nisinresistenten Staphylokokken verhielten sich gegenüber den Antibiotika Tetracyclin, Terramycin, Mycipen, Streptomycin und Penicillin in gleicher Weise wie der normale Staphylokokkenstamm vor seiner Resistenzsteigerung. Wir können zumindest für den Staph. aureus Sg 511 bei einer spezifischen Nisinresistenz eine allgemeine Antibiotikaresistenz ausschließen (vergl. Tab. 15).

|                   |                                   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tetra-<br>cyclin  | Verd. in $\gamma$ /ml<br>Wachstum | 5      | 2,5    | 1,25   | 0,625  | 0,3    | 0,15   | 0,075  | 0,0375 | 0,0188 |
|                   |                                   | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | +      | +      |
| Terra-<br>mycin   | Verd. in $\gamma$ /ml<br>Wachstum | 5      | 2,5    | 1,25   | 0,625  | 0,3    | 0,15   | 0,075  | 0,0375 | 0,0188 |
|                   |                                   | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | +      | +      | +      |
| ycli-<br>pen      | Verd. in $\gamma$ /ml<br>Wachstum | 2,5    | 1,25   | 0,6    | 0,3    | 0,15   | 0,075  | 0,0375 | 0,0188 | 0,0045 |
|                   |                                   | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | +      | +      |
| Strepto-<br>mycin | Verd. in $\gamma$ /ml<br>Wachstum | 50     | 25     | 12,5   | 6,25   | 3,125  | 1,5    | 0,75   | 0,375  | 0,188  |
|                   |                                   | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | +      | +      | +      |
| Peni-<br>cillin   | Verd. in $\Sigma$ /ml<br>Wachstum | 2,5    | 1,25   | 0,6    | 0,3    | 0,15   | 0,075  | 0,0375 | 0,0188 | 0,0045 |
|                   |                                   | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | $\rho$ | +      |

Tab. 15

Antibiotika-Sensibilität nisinresistenter Staphylokokken  
 Zeichenklärung: + = normales Bakterienwachstum

$\rho$  = Hemmung des Bakterienwachstums

### 17. Untersuchungen zum Nachweis einer "Nisinase"

Die Resistenzsteigerung der Staphylokokken gegenüber Nisin könnte durch einen vermehrten Abbau von Nisin zustandekommen, dem eine bessere Entwicklungsmöglichkeit von Staphylokokken entsprechen würde. So berichtet SEGALOVE (9), daß ein Bakterienstamm, der durch 30 E/ml Penicillin gehemmt wurde, zunächst keine extracelluläre Penicillinase bildete. Nach einer Resistenzsteigerung auf 2 000 E/ml war jedoch die Penicillinase nachweisbar. Der hypothetisch anzunehmende Abbau von Nisin kann entweder im Bacterium oder auch im Nährmedium stattfinden. Als Ursache dieser Inaktivierung kann ein Ferment angesehen werden. Andererseits ist mit einer nicht näher zu beschreibenden Adaptierung des Bacteriums an höhere Nisindosen zu rechnen, die sich auf eine spezifische Wirkung eines bestimmten Fermentes nicht zurückführen läßt.

#### Methodik:

Zur Untersuchung, ob ein fermentativer Abbau von Nisin in der Bouillon von nisinresistenten Staphylokokken erfolgt, nahmen wir 50 ml einer pH-6-Bouillon, die 2 000 E/ml Nisin enthielt, und beimpften sie mit 0,1 ml einer 24stündigen Bakterienkultur des oben erwähnten nisinresistenten Staph. aureus Sg 511. Nach einer Bebrütung bei 37° C wurden die Keime am nächsten Tag durch ein Membranfilter vom Nährmedium getrennt. Mit dem gewonnenen Filtrat und einer pH-6-Bouillon setzten wir eine geometrische Verdünnungsreihe an. Diese beimpften wir nun mit einem ge-

genüber Nisin normal empfindlichen Staph. aureus Sg 511. Nach 18stündiger Bebrütung wurde das Ergebnis abgelesen.

Das Kulturfiltrat einer nisinhaltigen Bouillon weist einen Wirksamkeitsverlust des Nisins durch die Filtration und den ständigen Abbau des Nisins in der Bouillon auf. Wenn wir dennoch die Nisinkonzentration unseres Kulturfiltrates von nisinresistenten Staphylokokken mit 2 000 E/ml annehmen, so ergibt sich theoretisch eine Wachstumshemmung bei 3,9 E/ml Nisin. Der übliche Hemmbereich für den verwendeten Staphylokokkenstamm liegt bei 2,5 E/ml. Vergleicht man die beiden Hemmbereiche miteinander, so muß man den Schluß ziehen, daß ein nennenswerter Abbau von Nisin, der die Nisinresistenz der Staphylokokken erklären könnte, im Kulturmedium nicht erfolgt ist. Wir können also die Existenz eines nisinspaltenden Fermentes ("Nisinase") in dem Kulturfiltrat von nisinresistenten Staphylokokken ausschließen. Damit stellt sich die andere Frage, ob in den Bakterien ein Ferment nachweisbar ist, das eine nisin-spaltende Wirkung hat.

#### Methodik:

Hierzu wurde 1 Liter einer pH-7-Bouillon mit einem nisinresistenten Stamm Staph. aureus Sg 511, der bei 2 000 E/ml Nisin noch wuchs, beimpft. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C wurden die Keime in der Kühlzentrifuge 20 Minuten bei 3 000 U/min sedimentiert. Daran schloß sich ein dreimaliger Waschvorgang mit einem Phosphatpuffer

von pH 7,2. Den verbleibenden Bodensatz schwemmten wir in der 2,5fachen Menge Aceton auf und stellten das Gemisch über Nacht in den Kühlschrank. In einem Mörser wurde nach Verdunstung der Flüssigkeit das verbleibende Medium mit der gleichen Menge Aluminiumstaub 20 Minuten lang verrieben, um einen teilweisen Zellaufschluß zu erreichen. Dieses Pulver wurde mit Aceton vermischt und darauf 10 Minuten lang bei 2 500 U je min und  $-10^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. In der überstehenden trüben Flüssigkeit glaubten wir, das nisinspaltende Ferment (die "Nisinase") als Extrakt vor uns zu haben und dampften es bei  $28^{\circ}\text{C}$  im Vacuum ein. Der im Destillierkolben verbleibende Rückstand reagierte 4 Stunden mit 2 ml einer Nisinlösung von 15 000 E/ml im Brutraum bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Als Kontrolle wurde eine normale Nisinlösung von 15 000 E/ml Nisin verwandt. Mit diesen beiden Nisinlösungen wurden zwei geometrisch absteigende Verdünnungsreihen angelegt. Die Beimpfung erfolgte mit einem Tropfen einer 24stündigen, 1:100 verdünnten Staph. aureus Sg 511 Kultur. Das Ergebnis lasen wir nach 12 und 40 Stunden ab, wobei die Testreihe einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt war. Zur Kontrolle wurde ein nicht nisinresistenter Staph. aureus Sg 511 der gleichen Methodik unterworfen.

Das Zellextrakt, aus nisinresistenten Staphylokokken gewonnen, zeigte nach 4stündiger Einwirkung auf Nisin einen über 50 %igen Abbau, während die Kontrolle diesen Abbau nicht zeigte (s. Tab. 16). Hieraus läßt sich schließen, daß in den nisinresistenten Staphylokokken Substanzen vorhanden sein müssen, die Nisin inaktivieren. Doch kann man mit den nachgewiesenen nisinspaltenden Substanzen die Nisinresistenz der untersuchten Staphylokokken allein nicht erklären.

| Nisin | Nisin ohne<br>"Nisinase"      |   | Nisin mit<br>"Nisinase"       |   |
|-------|-------------------------------|---|-------------------------------|---|
| E/ml  | Ablesg. nach<br>12std. 40std. |   | Ablesg. nach<br>12std. 40std. |   |
| 1 500 | -                             | - | -                             | - |
| 750   | -                             | - | -                             | - |
| 375   | -                             | - | -                             | - |
| 187,5 | -                             | - | -                             | - |
| 94    | -                             | - | -                             | - |
| 47    | -                             | - | -                             | - |
| 23,5  | -                             | - | -                             | + |
| 11,8  | -                             | - | -                             | + |
| 5,6   | -                             | + | +                             | + |
| 2,8   | -                             | + | +                             | + |
| 1,4   | +                             | + | +                             | + |

Tab. 16

Hemmkraft des Nisins gegenüber Staphyl. aur.  
Sg 511 nach Einwirkung der gewonnenen "Nisinase".

+ = Wachstum; - = kein Wachstum des Impfgutes

Zum Verständnis der Nisinresistenz lassen sich einige Tatsachen aus der Penicillinaseforschung anführen (14; 15). Man kann zeigen, daß verschiedene Stämme einer Bakterienart unterschiedliche Mengen Penicillinase bilden. Z.B. gibt es bei den Staphylokokken penicillin-empfindliche Arten, die wahrscheinlich keine Penicillinase bilden, während die Resistenz weni-

ger empfindlicher Stämme von der Höhe dieser Enzymbildung abhängig ist. Andererseits zeigten die in vitro resistent gewordenen Staphylokokken keinen Anstieg ihrer Penicillinaseproduktion, teilweise bildeten sie überhaupt keine Penicillinase. Der Penicillinasegehalt ist damit kein Indiz für die Höhe der Penicillinresistenz.

Wenn man diese Betrachtungen auf die Nisinresistenz anwendet, lassen sich von einer ermittelten nisin-spaltenden Substanz ("Nisinase") keine direkten Schlüsse auf die Resistenz der Bakterien ziehen.

### 18. Abnahme der Nisinresistenz

Wenn wir eine Bakterienresistenz gegenüber Nisin feststellten, wäre zu klären, ob diese Resistenz als manifest anzusehen oder mit einer Abnahme zu rechnen ist.

#### Methodik:

Ein Stamm Staph. aureus Sg 511, der bei 2 000 E je ml in einem pH-6-Pouillon noch wuchs, wurde auf eine pH-7-Bouillon überimpft. Täglich folgten weitere Nährbouillonpassagen. Die 24-Stundenkulturen wurden 1:100 verdünnt und ihre Empfindlichkeit erneut gegenüber einer geometrischen Verdünnungsreihe von Nisin geprüft. Nach 18- und 42stündiger Bebrütung wurde das Untersuchungsergebnis abgelesen.

In den 6 Untersuchungstagen tritt nach täglichen Nährbouillonpassagen bei den nisinresistenten Staphylokokken ein tägl. Resistenzverlust von 50 % ein (vergl. Tab. 17).

| Bouillonpassage                | 1.Tag | 2.Tag | 3.Tag | 4.Tag | 5.Tag | 6.Tag |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Bactericidie<br>bei Nisin E/ml | 2000  | 1000  | 500   | 250   | 125   | 62,5  |

Tab. 17

Abnahme der Nisinresistenz von nisinresistenten Staph. aur. Sg 511 nach täglichen Bouillonpassagen.

### 19. Verhalten von antibiotika-resistenten Staphylokokken gegenüber Nisin

Es stellt sich die Frage, wie sich Staphylokokken, die auf übliche Antibiotika nicht mehr ansprechen, gegenüber Nisin verhalten.

#### Methodik:

Es wurden 14 verschiedene antibiotikaresistente Staphylokokkenstämme genommen und ihr Verhalten gegenüber den Antibiotika Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin, Terramycin, Erythromycin und dem Sulfonamid Supronal getestet. Für jeden Staphylokokkenstamm wurde eine Verdünnungsreihe von Nisin in den Werten zwischen 300 E/ml und 1,2 E je ml mit einer pH-6-Bouillon angelegt. Die Untersuchungsröhrchen der Verdünnungsreihe wurden mit je einem Tropfen einer 1:100 verdünnten 24-Stunden-Kultur beimpft. Nach 18- und 40stündiger Bebrütung bei 37° C wurde das Ergebnis abgelesen.

Während der übliche Staph. aureus Sg 511 bei 2,4 E je ml Nisin noch gerade wächst, zeigen die meisten antibiotikaresistenten Staphylokokkenstämme eine Wachstumshemmung erst im Bereich von 37,5 bis 150 E je ml Nisin. Unter den 14 getesteten Stämmen waren 3, die bei einer Nisinkonzentration von 300 E/ml noch gut wuchsen.

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß Staphylokokken, die gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika unempfindlich sind, mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf Nisin schlecht ansprechen (s. Tab. 18).

| Stamm                                      | Penicillin | Chloromycetin | Streptomycin | Terramycin | Erythromycin | Supronal | Nisin E/ml    |             |
|--------------------------------------------|------------|---------------|--------------|------------|--------------|----------|---------------|-------------|
|                                            |            |               |              |            |              |          | Bacteriostase | Bactericide |
| Staph. aureus                              | Ø          | Ø             | Ø            | Ø          | +            | +        | 150,0         | 150,0       |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 150,0         | 37,5        |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 300,0         | 75,0        |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 150,0         | 75,0        |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 150,0         | 150,0       |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 75,0          | 37,5        |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | +          | +            | +        | 150,0         | 37,5        |
| " "                                        | Ø          | +             | +            | +          | +            | +        | 75,0          | 75,0        |
| " "                                        | Ø          | +             | +            | +          | +            | +        | Ø             | 150,0       |
| " "                                        | Ø          | +             | +            | +          | +            | +        | 300,0         | 150,0       |
| Schwach haem.                              |            |               |              |            |              |          |               |             |
| Staph. aur.                                | Ø          | Ø             | Ø            | Ø          | +            | +        | Ø             | Ø           |
| " "                                        | Ø          | +             | Ø            | Ø          | +            | +        | 75,0          | 9,4         |
| Staph. albus                               | Ø          | +             | +            | +          | +            | +        | 18,75         | 18,75       |
| Bakt. d. Klebsiella-gruppe, vergr. Strept. | Ø          | Ø             | Ø            | +          | +            | +        | Ø             | Ø           |
| Staph. albus Sarcine                       |            |               |              |            |              |          |               |             |

Tab. 18

Das Verhalten antibiotika-resistenter Staphylokokken gegenüber Nisin.

Zeichenerklärung: + = empfindlich

Ø = unempfindlich

## 20. Einwirkung der Penicillinase auf Nisin

Öfter wird bei einer Penicillinresistenz eine Vermehrung der Penicillinase angetroffen. Andererseits stellten wir im vorigen Versuch bei penicillinresistenten Staphylokokken auch eine Nisinresistenz fest. So bot sich die Untersuchung der Penicillinase in ihrer Einwirkung auf Nisin an.

### Methodik:

Eine Nisinlösung von 4 000 E/ml Nisin in Aqua dest. wurde 5 Stunden einem gleichen Anteil Penicillinase ("Penase Concentrate" von den Difco-Laboratories, Detroit 1, Michigan) bei Zimmertemperatur ausgesetzt. Nach dieser Zeit legten wir eine geometrische Verdünnungsreihe durch Verdünnen mit einer pH-6-Bouillon an. Das gleiche Verfahren wurde mit einer Penicillinase durchgeführt, die, bevor sie dem Nisin zugegeben wurde, 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt worden war. Jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe wurde mit einem Tropfen einer 1:100 verdünnten 24-Stunden-Bouillon von Staph. aureus Sg 511 beimpft und am nächsten Tag das Ergebnis abgelesen.

Während die übliche Hemmung des Bakterienwachstums bei dem Teststamm um 3 E/ml lag, sahen wir in den angesetzten Verdünnungen von 1 000 E/ml bis 1,75 E je ml eine Trübung. Der Versuch zeigt demnach, daß das Polypeptid Nisin durch die Penicillinase seine hemmende Wirkung auf das Strophokokkenwachstum verliert. Ein anderes Ergebnis erhielten wir, wenn die Penicillinase zuvor 5 Minuten lang gekocht worden war. Das Röhrchen, in dem gerade noch ein Wachstum erkennbar war, hatte bei dieser Versuchsanordnung eine Einheitenzahl von 15,5 E/ml.

Die Penicillinase besitzt eine inaktivierende Wirkung auf das Nisin, und diese Wirkung ist durch Erhitzen der Penicillinase zu einem Teil aufhebbar. Ob diese Wirkung allein von der Penicillinase ausgeht oder das Ergebnis vielleicht durch Verunreinigungen mit anderen proteolytischen Fermenten stark beeinflußt wird, ist schwer zu beurteilen.

## 21. Nisin-Blutspiegel

Aus der Literatur waren uns Blutspiegeluntersuchungen nach i.v.-, i.m.- und s.c.-Injektion (s. S. 26, 27) bekannt. Zusätzlich interessierte uns die Höhe des Nisinspiegels im Blut nach der Applikation einer Suspension und die Wirkung einer intraperitonealen Injektion.

### Methodik:

Einem etwa 2 kg schweren Kaninchen wurden 400 000 E Nisin, die in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert waren, i.m. in den Schenkel injiziert. Bei einem zweiten Versuch lösten wir die 400 000 E Nisin in 25 ml physiologischer NaCl-Lösung auf und gaben die gesamte Menge intraperitoneal. Sterile Blutentnahmen erfolgten nach 15 Minuten, 1, 2, 3 und 5 Stunden. Das aus dem Blut durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde mit pH-6-Bouillon in geometrischer Folge verdünnt und mit einem Tropfen einer 1:100 verdünnten 24-Stunden-Kultur von *Staph. aureus* Sg 511 beimpft. Die Verdünnungsreihen bebrüteten wir bei 37° C und lasen das Ergebnis nach 18 und 40 Stunden ab. Von jedem Röhrchen wurde anschließend eine Subkultur auf Nähragar angelegt.

Die i.m.-Injektion einer Nisinsuspension zeigte nach Auswertung der Ergebnisse keine hemmende Wirkung des Serums auf Staph. aureus Sg 511 im Verdünnungstest. Hieraus kann man schließen, daß eine Lösung des Nisins im Blut wegen seines pH-Wertes von 7,2 nicht mehr stattfindet. Außerdem war es bekannt, daß eine i.m.-Applikation von Nisin nur eine verhältnismäßig geringe Blutspiegelwirkung gegenüber einer i.v.-Injektion aufweist.

Anders fiel die Blutspiegeluntersuchung nach i.p.-Verabreichung des Nisin aus. Wir sahen einen kontinuierlichen Abfall der Nisinkonzentration im Serum des lebenden Kaninchens. Wenn man 2,5 E/ml als die Nisinkonzentration ansieht, bei der ein Wachstum gerade nicht mehr erfolgte (Bakteriostase), so läßt sich ableiten (s. Tab. 19), daß nach 15 Minuten eine Nisinkonzentration zwischen 20 - 40 E/ml im Blut vorhanden gewesen sein muß. Nach einer Stunde fiel dieser Wert auf 10 - 20 E/ml, nach 2 Stunden schließlich auf 5 - 10 E/ml, um nach 5 Stunden bei etwa 2,5 E/ml zu liegen. Bei dem letzten Wert müssen wir die normale Bakteriostase des Serums mit berücksichtigen. Die nach 40 Stunden angelegte Subkultur wies in allen Untersuchungsröhrchen noch Staphylokokken auf, so daß man folgern muß, daß bei ähnlichen i.p.-Applikationen nur eine Bakteriostase, aber keine Bakterizidie auftritt.

| Serum-<br>verdünnung | konz. | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
|----------------------|-------|-----|-----|-----|------|------|
| 15 min               | Ø     | Ø   | Ø   | Ø   | +    | +    |
| 1 Std.               | Ø     | Ø   | Ø   | +   | +    | +    |
| 2 Std.               | Ø     | Ø   | +   | +   | +    | +    |
| 3 Std.               | Ø     | Ø   | +   | +   | +    | +    |
| 5 Std.               | Ø     | +   | +   | +   | +    | +    |

Tab. 19

Nisinblutspiegelbestimmung bei einem Kaninchen nach einer intraperitonealen Injektion von 400 000 E Nisin. Die Blutabnahme erfolgte nach der Nisininjektion in den oben angegebenen Zeitabständen. Die hemmende Wirkung des Serums wurde gegenüber *Staph. aureus* Sg 511 getestet.

Zeichenerklärung: + = Wachstum

Ø = kein Wachstum

der Testbakterien

## 22. Komplementtiter nach Nisinsgaben

Das Komplement spielt in dem Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Bakteriolyse und Hämolyse, bei der Properdinbindung und vielleicht auch bei der opsonischen Wirkung eine Rolle. SCHMIDT (40) beschreibt das Komplement als ein funktionelles System, nicht als eine chemische Substanz bestimmter Konstitution. Es läßt sich heute in 5 Faktoren zerlegen; jeder dieser Faktoren kann in wechselnder Weise bei lytischen oder Immunisierungsvorgängen beteiligt sein. Einen Schluß von dem im üblichen Verfahren bestimmten Komplementtiter auf seine Wirkung in einem der oben auf-

gezählten Vorgänge zu ziehen, ist daher fast unmöglich. Die Abhängigkeit des Komplementtiters, z.B. von Wettervorgängen, von der Ernährung, von der vegetativen Tonuslage, läßt die Frage zu, ob nicht Krankheit erzeugende Faktoren ihren Ausdruck in der Höhe des Komplementtiters finden können. Andererseits war eine regelmäßige Verminderung oder gar ein Schwund von Komplement im Verlauf von Infektionskrankheiten nicht zu beobachten. Komplementlose Meerschweinchen zeigten sogar bei Infektionskrankheiten keinen Resistenzunterschied gegenüber komplementhaltigen. Auch entsprechen sich z.B. nicht Komplement- und Properdingehalt der Sera. Das hochgradig komplementhaltige Meerschweinchen Serum hat den niedrigsten Properdintiter (1-2). Andererseits ist zur Properdinwirkung, die sich in einer Hämolyse, Bakterizidie und Virusneutralisation äußert, das Komplement (neben  $Mg^{++}$ ) notwendig. Ebenso wird die Höhe der Hämolyse bei manchen Antigen-Antikörper-Reaktionen von der Menge des vorhandenen Komplements her bestimmt. Wir können demnach zwar nicht von einer Schwankung im Komplementgehalt auf den Antikörper-, Properdin- und Opsoningehalt in den Sera schließen und damit direkte Schlüsse auf Abwehrkraft und Immunisierungsvorgänge ziehen. Es bleibt uns aber die Möglichkeit, mit Hilfe des Komplementtiters eine Mitbeeinflussung der Eiweißfraktion des Serums festzustellen.

## Methodik:

Neun männliche Meerschweinchen, etwa 500 g schwer, wurden bei Versuchsbeginn nach 1 und 2 Wochen herzpunktiert und das gewonnene Serum im Komplementauswertungstest bestimmt. Während des Versuches erhielten 3 Meerschweinchen täglich 10 000 E Nisinlösung intraperitoneal. Drei weiteren Meerschweinchen wurde die Nisinlösung nur in der ersten und physiologische Kochsalzlösung in der nächsten Woche verabreicht. Den restlichen 3 Meerschweinchen applizierten wir in diesen 14 Tagen intraperitoneal physiologische Kochsalzlösung zur Kontrolle.

## Komplementauswertungstest (45):

Zur Komplementauswertung wurden Verdünnungen des Meerschweinchen-serums 1:5 und 1:10 hergestellt und den ersten Reagenzgläsern 0,5 ml der Verdünnung 1:5, den weiteren 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml, 0,25 ml, 0,15 ml, 0,1 ml und 0,05 ml der Verdünnung 1:10 zugeteilt. Unter Zugabe von 0,5 ml einer 5 %igen Hammelblutkörperchenausschwemmung, 0,5 ml eines mit physiologischer NaCl-Lösung 1:500 verdünnten hämolytischen Ambozeptors und Auffüllung der Röhrchen mit physiologischer NaCl-Lösung auf 2,5 ml erhält man schließlich Lösungen des bereits 1:5 verdünnten Serum im Verhältnis 1:5; 1:10; 1:12,5; 1:16,6; 1:25; 1:33,3; 1:50; 1:100.

Wir sehen bei Meerschweinchen nach 7tägiger intraperitonealer Applikation von 10 000 E Nisin ein leichtes Absinken des Komplementgehaltes im Serum um durchschnittlich 1 - 2 Werte innerhalb der Verdünnungsreihe (s. Tab. 20). Die 3 Kontrolltiere, die physiologische NaCl-Lösung erhielten, zeigten nicht diese Komplementabnahme.



Die Tabelle gibt die Einwirkung von intraperitoneal appliziertem Nisin auf den Komplementgehalt des Serums wieder. Der Komplementauswertungstest wurde am Anfang des Versuches (Auswertung 1), nach 1 (Auswertung 2) und nach 2 Wochen (Auswertung 3) durchgeführt.

Zeichenerklärung:

Ø = Hämolyse (Komplement vorhanden)

+ = keine Hämolyse (nicht genügend Komplement)

Als nach weiteren 7 Tagen der Komplementauswertungstest durchgeführt wurde, war der anfangs aufgetretene Komplementschwund bei den ersten 3 Meerschweinchen trotz weiterer Nisininjektionen nicht mehr nachzuweisen. Die übrigen 6 Tiere zeigten erwartungsgemäß, nachdem sie täglich physiologische NaCl-Lösung erhalten hatten, keine Änderung des normalen Komplementgehaltes im Serum.

Der Versuch sagt uns, daß nach Nisingaben zunächst eine leichte Senkung des Komplementgehaltes im Serum auftreten kann, die aber nach einiger Zeit sich wieder rückbilden wird. Doch ist bei der Auswertung zu berücksichtigen, daß der Titer in den Bereichen 1:10 bis 1:16,6 schwankt. Diese geringen Schwankungen können schon durch eine andere Fütterungsmethode, durch Klimaänderungen oder durch sonstige äußere Einflüsse auftreten und sind in ihrem Aussagewert kritisch zu bewerten.

### 23. Künstlicher Herdinjekt und Nisin

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Blutspiegelbestimmung, der Komplementschwundreaktion und aufbauend auf Angaben in der Literatur untersuchten wir die Wirkung von Nisin auf einen künstlich gesetzten Herdinjekt.

#### Methode:

Vier männlichen Ratten wurde auf die linke und rechte Seite je ein steriler Wattetampon zwischen den musculus abdominis externus und internus eingepflanzt und die Wundöffnung vernäht. Nach neunmonatiger reizloser Einheilung wurde jeder Tampon mit 0,3 ml einer 24-Stunden-Bouillon von haemolytischen Streptokokken Gruppe A infiziert. Zwei Ratten erhielten post infectionem nach 1, 3, 6, 12 und dann alle 12 Stunden jeweils 10.000 U Nisin intraperitoneal. Den anderen 2 Ratten applizierten wir zur gleichen Zeit das gleiche Volumen physiologischer NaCl-Lösung. Nach 4 Tagen zeigten die 2 Kontrolltiere Krämpfe und andere schwere Krankheitssymptome, während die nisinbehandelten Tiere sich unauffällig verhielten. Die Sektion wurde zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Von verschiedenen Organen wurden steril entnommene Abstriche auf Blutagar hergestellt und bei 37° C bebrütet. Außerdem untersuchten wir wichtige Organe histologisch.

Sowohl bei den 2 Kontrollratten, denen wir NaCl-Lösung appliziert hatten, wie bei den 2 mit Nisin behandelten Tieren fanden sich innerhalb der infizierten Wattetampons massenhaft haemolytische Streptokokken. Die bakteriologische Untersuchung des Herzblutes ergab bei den Kontrolltieren reichlich Streptokokken, dagegen zeigten die Nisintiere

im Blut keine Bakterien. Auch die Peritonealhöhle war bei den nicht behandelten Tieren infiziert.

Die histologische Beurteilung wurde vom hiesigen Pathologischen Institut vorgenommen. Auffällige Unterschiede an den Wattetampons waren nicht zu erkennen. Das Granulationsgewebe war teilweise nekrotisch. Bei allen Tieren zeigte die Leber eine fettige Degeneration, während die Nieren keine Veränderungen aufwiesen. Bei den mit Nisin behandelten Tieren konnte man keine Entzündungserscheinungen an der Herzmuskulatur oder in der Milz feststellen, dagegen sah man bei den Kontrolltieren eine interstitielle Myocarditis mit Nekroseherden. Die Milz war bei diesen Ratten entzündlich verändert, das Reticulum geschwollen. Im Interstitium befanden sich massenhaft Leukocyten.

Der Tierversuch zeigte, daß eine Sepsis durch die Nisinbehandlung verhindert werden konnte. Ebenso eine Myocarditis und ein Milztumor. Ein deutlicher Einfluß auf den künstlich gesetzten Herdinjekt, den infizierten Wattetampon in der Bauchmuskulatur, war nicht festzustellen. Auch hier scheint die niedrige Dosierung, die eine zu geringe Nisinkonzentration im Tampon zur Folge hatte, keine Bakterizidie im Tampon zu bewirken. Es ist auch fraglich, wie weit eine Diffusion von Nisin in ein vernarbtes Gewebe oder durch dasselbe möglich ist.

## 24. Tetanusinfektion und Nisin

Zur Prophylaxe einer Tetanusinfektion könnte evtl. auch eine Substanz verwendet werden, die hochgradig bakterizid auf Tetanusbazillen wirkt. Wir fragten uns daher, ob Nisin in vivo eine solche Eigenschaft besitzt.

### Methodik:

Zwanzig Mäuse, die durchschnittlich etwa 15 g wogen, erhielten 0,1 ml einer 1:300 verdünnten 24-Stunden-Leber-Bouillon von *Plectridium tetani* oberhalb der Schwanzwurzel injiziert. Gleich nach dieser Injektion begannen wir mit der Nisinbehandlung. In Zeitabständen von 0, 1, 4, 9, 14, 17 und 23 Stunden nach der Infektion applizierten wir den ersten 10 Mäusen intraperitoneal jeweils 0,6 ml einer 600 E/ml enthaltenden Lösung von Nisin. Die Tiere erhielten also  $360 \text{ E}/15 \text{ g} = 24 \text{ 000 E/kg}$ . Den anderen 10 Tieren wurde zur gleichen Zeit intraperitoneal die gleiche Menge physiologischer NaCl-Lösung verabreicht.

Die mit Nisin behandelten Mäuse lebten um einige Stunden länger als die nicht behandelten Tiere (s. Tab. 21). Doch waren die 5 getöteten Mäuse in einem moribunden Zustand, so daß mit ihrem Ableben bald zu rechnen war.

Aufgrund der verwendeten Versuchsanordnung (zu geringe Nisindosen und zu kurze Sterbezeit der Kontrolltiere), können wir Endgültiges über eine Wirkung von Nisin auf eine Tetanusinfektion nicht aussagen. Doch ist diese Frage nur theoretisch zu sehen, denn man wird einer Nisinbehandlung eine aktive (bzw. nach der Infektion eine passive) Immuni-

sierung gegen Tetanus vorziehen. Denn nicht der Bazillus bedeutet die eigentliche Gefahr, sondern dessen abgeschiedene Toxine. Diese können noch nach Monaten gebildet werden, wenn nicht alle Sporen vernichtet worden sind. Sich auf eine bakterizide Wirkung des Nisins zu verlassen, wäre im Verhältnis zur Immunisierung ein Risiko.

| Absterbezeit<br>nach | phys. NaCl<br>Lsg. i.p. | Nisin<br>Lsg. i.p. |
|----------------------|-------------------------|--------------------|
| 7 Std.               | -                       | -                  |
| 14 Std.              | -                       | -                  |
| 21 Std.              | 3                       | -                  |
| 28 Std.              | 3                       | -                  |
| 35 Std.              | 1                       | 4                  |
| 42 Std.              | 3                       | 1                  |
| 49 Std.              | -                       | -                  |
| getötet              | -                       | 5                  |

Tab. 21

Absterbezeit von 20 Mäusen, die mit *Plectridium tetani* infiziert waren. Davon wurden 10 Mäuse intraperitoneal mit einer Nisinlösung behandelt.

## 25. Grippe-Viren und Nisin

Ein spezifisches Mittel gegen Vireninfektionen fehlt bislang. Daher war die Untersuchung des Einflusses von Nisin auf Viren angezeigt. Zunächst wurden zur Testung der Nisinwirkung Eier verwendet, die mit Grippe-Viren infiziert waren.

### Methodik:

Dreizehn frische, befruchtete Hühnereier wurden im Brutschrank bei  $38^{\circ}\text{C}$  zehn Tage lang aufbewahrt und täglich zweimal gewendet. Am elften Tag wurde die Einstichstelle nach der Markierung jodiert und durchstoßen. In die Allantoishöhle impften wir je 0,3 ml Flüssigkeit, die sich aus verschiedenen Substanzen zusammensetzte: 4 Eier erhielten 1 000 E Nisin in einer Grippevirenaufschwemmung 1:10 000. Weiteren 4 Eiern wurde eine gleiche Virenaufschwemmung appliziert, die aber nicht 1 000 E, sondern 500 E Nisin enthielt. Als Kontrolle verwendeten wir einerseits 3 Eier, die mit einer Virenaufschwemmung 1:10 000 beimpft wurden, und andererseits 2 Eier, deren eines 1 000 E, das andere 500 E Nisin erhalten hatte. Den Eischalendefekt schlossen wir mit Paraffin und bebrüteten die Eier weitere 24 Stunden bei  $38^{\circ}\text{C}$ . Die anschließend in den Brutschrank gelegten Eier wurden am nächsten Tag an ihrem stumpfen Pol geöffnet, die Chorioallantoische Membran perforiert und Allantoisflüssigkeit entnommen. Die Auswertung erfolgte im Hämagglutinationstest. Zunächst stellten wir eine Verdünnungsreihe der Allantoisflüssigkeit mit physiologischer NaCl-Lösung her, und zwar beginnend bei 1:5, geometrisch fortschreitend bis 1:10 240. Zu diesen 0,5 ml der Antigenverdünnung gaben wir zusätzlich 0,5 ml Hühnererythrocyten, die mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1:200 verdünnt worden waren. Nach 75 Minuten wurde der Test abgelesen. Eine Agglutination zeigte ein Vorhandensein von Antigen, d.h. Viren, an (s. Tab. 22).

## Verdünnung der Allantoisflüssigkeit

|                                 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |
|---------------------------------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| 1 Nisin ohne Viren (Kontrollen) | ♂   | ♂    | ♂    | ♂    | ♂    | ♂     | ♂     | ♂     | ♂      | ♂      |
| 2                               | ♂   | ♂    | ♂    | ♂    | ♂    | ♂     | ♂     | ♂     | ♂      | ♂      |
| 3                               | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 4 1000 E Nisin + Viren          | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 5 aufschwemmung                 | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 6                               | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 7                               | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 8 500 E Nisin + Viren           | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 9 aufschwemmung                 | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 10                              | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 11 kein Nisin                   | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |
| 12 Virenaufschwemmung           | +   | +    | +    | +    | +    | +     | +     | +     | +      | +      |

Tab. 22

Haemagglutinationstest, ausgeführt zur Untersuchung der Nisineinwirkung auf Grippeviren.

Zeichenklärung: + = Agglutination der Hühnerythrozyten (Viren vorhanden)

Eine Agglutination der Allantoisflüssigkeit gegenüber Hühnererythrocyten fehlte nur bei den beiden Eiern, denen 1 000 bzw. 500 E Nisin ohne Viren in die Allantoishöhle injiziert worden war. Doch alle Eier, die mit Grippeviren infiziert waren, auch die Eier, die Nisin erhalten hatten, gaben eine gleich starke Agglutination. Es ist aus diesen Versuchsergebnissen nicht zu entnehmen, daß Nisin eine inaktivierende Wirkung auf die Grippeviren ausüben kann.

## 26. Nisinwirkung bei Vireninfektionen

Weiterhin untersuchten wir die Wirksamkeit von Nisin bei Vireninfektionen der Mäuse. Wir verwendeten als Infektionsmaterial Herpes- und Theiler-Virus.

### Methodik:

Das Gehirn von Mäusen, die an Poliomyelitis bzw. an Herpes erkrankt und gestorben waren, wurde durch Schütteln mit Glasperlen in einer physiologischen NaCl-Lösung zerkleinert. Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit bei Herpesvirus im Verhältnis 1:1 000 und bei Theilervirus im Verhältnis 1:1 000 000 verdünnt. 0,03 ml dieser Virenaufschwemmungen erhielten intracerebral je 20 Mäuse, die durchschnittlich 10 g wogen. Als Kontrolle dienten 10 Mäuse, denen physiologische NaCl-Lösung statt der Virenaufschwemmung intracerebral appliziert worden war.

Nachdem wir eine Nisinlösung von 600 E/ml hergestellt hatten, gaben wir der Hälfte der Tiere von dieser Lösung 0,5 ml intraperitoneal, d.h. es erhielten je 10 mit Theiler- bzw. 10 mit Herpesvirus infizierte Mäuse und 5 der Kontrolltiere

das Nisin. Den anderen Tieren wurde intraperitoneal physiologische NaCl-Lösung gegeben. Wir applizierten in folgenden Zeitabständen: 2, 4, 8, 19, 38 Stunden und an den beiden darauffolgenden Tagen jeweils einmal täglich.

In der Annahme, daß eine intraperitoneale Injektion einen ähnlichen Nisinblutspiegel zur Folge hat wie eine i.v.-Applikation, gaben wir nach den Angaben bei MATTICK und HIRSCH  $30 \text{ mg/kg} = 300 \text{ E/10g}$ , das sind 0,5 ml unserer angewendeten Nisinlösung. Mit den zunächst häufigen, dann aber immer weniger schnell aufeinander folgenden i.p.-Injektionen wollten wir einen etwa gleich bleibenden Nisinblutspiegel aufrecht erhalten, wie es von MATTICK und HIRSCH (22) angegeben worden war.

Bei der Theiler- und bei der Herpes-Virusinfektion sehen wir eine leichte Verzögerung der Absterbezeit bei den mit Nisin behandelten Tieren. In beiden Fällen überlebte je eine nisinbehandelte Maus mehr die Infektion als bei den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Tieren. Dennoch ist der Versuch nicht so augenfällig, daß man eine Wirkung des Nisins auf die getesteten Viren annehmen könnte (s. Tab. 23 und Tab. 24).

| Über-<br>lebens-<br>tage | phys.<br>NaCl<br>i.p. | Nisin<br>-Lsg.<br>i.p. | Über-<br>lebens-<br>tage | phys.<br>NaCl<br>i.p. | Nisin<br>-Lsg.<br>i.p. |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1                        | -                     | -                      | 1                        | -                     | -                      |
| 2                        | -                     | -                      | 2                        | -                     | -                      |
| 3                        | -                     | -                      | 3                        | 2                     | -                      |
| 4                        | 1                     | -                      | 4                        | 1                     | 2                      |
| 5                        | -                     | -                      | 5                        | -                     | 1                      |
| 6                        | 1                     | -                      | 6                        | -                     | -                      |
| 7                        | -                     | -                      | 7                        | 1                     | 1                      |
| 8                        | 4                     | 2                      | 8                        | 2                     | 1                      |
| 9                        | 1                     | 3                      | 9-14                     | -                     | -                      |
| 10                       | -                     | -                      | getötet                  | 3                     | 4                      |
| 11                       | -                     | 2                      | Summe                    | 9                     | 10                     |
| 12                       | 1                     | -                      |                          |                       |                        |
| 13                       | -                     | -                      |                          |                       |                        |
| 14                       | -                     | -                      |                          |                       |                        |
| getötet                  | 2                     | 3                      |                          |                       |                        |
| Summe                    | 10                    | 10                     |                          |                       |                        |

Tab. 24

Absterbezeit von Mäusen, die mit Theiler-Viren infiziert waren und von denen die Hälfte der Tiere mit Nisin behandelt wurde.

Tab. 23

Absterbezeit von Mäusen, die mit Herpesviren infiziert waren und von denen die Hälfte der Tiere mit Nisin behandelt wurde.

## 27. Zusammenfassung

Das Polypeptid Nisin ist ein Stoffwechselprodukt bestimmter Stämme des *Streptococcus lactis*. Es läßt sich in 4 Fraktionen zerlegen: Nisin A, B, C, D. In vitro wie auch in vivo zeigt es gegenüber grampositiven Bakterien und Bazillen eine bakterio-statische und bakterizide Wirkung.

Der Diffusionstest, als Lochtest ausgeführt, ist zum Nachweis der Nisinwirkung nicht geeignet. Die Molekulargröße des Nisins scheint die Diffundierbarkeit stark einzuschränken. Bei einem pH von 7 kommt erschwerend die baldige Inaktivierung des Nisins im neutralen und alkalischen Bereich hinzu. Den Verdünnungstest verwendeten wir bei einem pH von 6 zum Nachweis der Nisinwirkung. Grampositive Bakterien, ausgenommen *Streptococcus faecalis* und einige antibiotika-resistente Keime, wurden in ihrem Wachstum gehemmt. Mit der mikromanometrischen Bestimmung des  $O_2$ -Verbrauches nach WARBURG untersuchten wir den Stoffwechsel von Bakterien. Am empfindlichsten reagierte der *Staph. aureus* Sg 511 in der lag-phase. Zur Auslösung einer gleichen Wirkung in der Wachstumsphase sind etwas höhere Nisin-Konzentrationen nötig. Auch auf dem Höhepunkt des Stoffwechsels, bei maximaler Keimzahl, kann eine bakterio-statische und bei höheren Nisindosen eine bakterizide Wirkung erzielt werden. Innerhalb von 10 Tagen senk

die Nisinkonzentration einer nisinhaltigen Bouillon, wenn sie bei 37° C gelagert wurde, um 50 %. Die Aufbewahrung bei 4° C veränderte die Konzentration nicht wesentlich. Die Resistenz von Bakterien (*Staph. aureus* Sg 511, *Bac. subtilis* und *Bac. mesentericus*) nach täglichen subletalen Nisin-Bouillonpassagen nahm sehr schnell zu. Nach der 17. Passage wuchs der *Staph. aureus* Sg 511 bei 2 000 E/ml. Der Resistenzverlust nach Nährbouillonpassagen liegt bei etwa 50 % pro Tag.

Die Nisinresistenz hatte keine Antibiotikaresistenz zur Folge. Eine nisinspaltende Substanz ("Nisinase") ließ sich zwar nicht im Kulturfiltrat, jedoch im Zellenextrakt von nisinresistenten Staphylokokken nachweisen. Diese Substanz baut das Nisin bei 37° C in 4 Stunden zu etwa 50 % ab. Doch läßt sich die Nisinresistenz allein durch das gewonnene nisinspaltende Ferment nicht erklären. Die Penicillinase ist in der Lage, das Nisin zu inaktivieren.

Die i.m.-Injektion einer Nisinsuspension führte nicht zu nachweisbarem Konzentrationsanstieg im Blut. Dagegen konnten wir nach intraperitonealer Injektion einer Nisinlösung einen Nisinblutspiegel über 5 Stunden feststellen. Tägliche i.p.-Nisinapplikationen bei Meerschweinchen führten in der ersten Woche zu leichter Senkung des Komplementgehaltes, während nach der zweiten Woche das Komplement wieder auf der Höhe des Ausgangswertes lag. Beziehungen zur Immunität über die Properdinbindung des C-3 und die Antikörperwir-

kung können bestehen. Hämolytische Streptokokken wurden in einen gut eingeeheilten Wattetampon gespritzt und die Wirkung von Nisin an diesem modellmäßigen Herdinfekt untersucht. Die Nisinwirkung reichte im Wattetampon zu einer Bakterizidie nicht aus. Dagegen konnte eine allgemeine Sepsis, wie sie sich bei den Kontrolltieren ausbildete, durch das Nisin verhindert werden. Im Mäuseversuch wurde nachgewiesen, daß einer Tetanusinfektion durch Nisingaben, im Verhältnis zur aktiven und passiven Immunisierung, nicht wirkungsvoll genug begegnet werden kann. Ebenso konnte ein signifikantes Ergebnis nach Einwirkung des Nisins auf Theiler- und Herpes-Virus-Infektionen nicht festgestellt werden. Das Nisin zeigte keinen Einfluß auf die Entwicklung des Grippevirus in der Allantoisflüssigkeit.

28. Literaturverzeichnis

- 1) Baribo, L.E., und Foster, E.M.: J. Dairy. Sci. 34 (1951): 1136
- 2) Bavin, E.M., und Beach, A.S.: Lancet 262 (1952): 129
- 3) Beach, A.S.: J. gen. Microbiol. 6 (1952): 60
- 4) Berridge, N.J.: Biochem. J. 45 (1949): 486
- 5) derselbe: Nature 169 (1952): 707
- 6) Berridge, N.J., und Barret, J.: J. gen. Microbiol. 5 (1951): 830
- 7) dieselben: Nature 167 (1951): 448
- 8) Berridge, N.J., Newton, G.G., und Abraham, E.P.: Biochem. J. 52 (1952): 529
- 9) Bondi, A.Jr., und Dietz, C.C.: Proc. soc. exper. Biol. N.Y. (1956): 132
- 10) Callow, R.K., und Work, T.S.: Biochem. J. 51 (1952): 558
- 11) Consden, R., Gordon, A.H., und Martin, A.I.P.: Biochem. J. 58 224
- 12) Cox, G.A.: New Zealand J. Agricult. 49 (1934): 231
- 13) Craig, Hausmann, Ahrens und Harfenist: Anal. Chem. 23 (1951): 1236
- 14) Florey, H.W., Chain, E., Haetley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.R., und Florey, M.E.: Antibiotics. Oxford Medical Publ. Bd. I (1949): London
- 15) dieselben: ibidem Bd. II

- 16) Gordon, A.H., Martin, A.I.P.,  
und Sygne, R.L.M.: Biochem. J. 37  
(1943): 86
- 17) Gowans, I.L., Smith, N., und  
Florey, H.W.: Brit. J. Pharma-  
col 7 (1952): 438
- 18) Hirsch, A.: J.gen.Microbiol.  
4 (1950): 70
- 19) derselbe: Nature 167  
(1951): 1031
- 20) derselbe: J.gen.Microbiol.  
5 (1951): 208
- 21) Hirsch, A., Grinsted, E.,  
Chapman, H., und Mattick,  
A.T.R.: J. Dairy, Res.  
18 (1951): 205
- 22) Hirsch, A., und Mattick, A.T.R.: Lancet (1949):  
190
- 23) Hirsch, A., und Wheeler, D.M.: J. Dairy.Res.  
18 (1950): 139
- 24) Hood, E.G., und Smith, K.N.: Sci. Agric.  
31 (1951): 530
- 25) Kooy, I.S., und Pette, I.W.: Neth. milk Dairy.  
J. 6 (1952): 302,  
317
- 26) Kundrat, W.: Dtsch.Molk.Ztg.  
77 (1956): 1447
- 27) Lewis, J.C., Humphreys, E.M.,  
Thompson, P.A., Dimick, K.P.,  
Benedict, R.G., Langlykke, A.  
F., und Lightbody, H.D.: Arch. Biochem.  
N.Y. 14 (1947):  
530
- 28) Lewis, J.C., Michener, H.D.,  
Stumbo, C.R., und Dudley, S.T.: Agric. Food Chem.  
2 (1954): 6
- 29) Mattick, A.T.R., und Hirsch, A.: Nature 154  
(1944): 551
- 30) dieselben: Lancet 153  
(1947): 5

- 31) Mc Clintock, M., Serres, L., J.Dairy.Res. 19  
Marzolt, I.I., Hirsch, A., und (1952): 187  
Hoquot, G.:
- 32) Möhle, W.: Chem.Ing.Techn. 22 (1950): 416
- 33) derselbe: ibidem 23  
(1951): 576
- 34) Newton, G.G., und Abraham, Nature 171  
E.P.: (1953): 606
- 35) Oxford, A.E.: Biochem.J. 38  
(1944): 178
- 36) Patent Specification: Patent Office,  
London No. 683423  
(1952)
- 37) Pulay, G., und Csizar, J.: Ber. Weltmilch-  
kongr. Rom, 2  
(1956): 423
- 38) Rammelkamp, C.H., und Wein- Proc.Soc.Exp.  
stein, L.: Biol. Med. 48  
(1941): 211
- 39) Rogers, L.A.: J. Bact. 16  
(1928): 321
- 40) Schmidt, H.: Fortschritte der  
Serolog., Stein-  
kopff Darmstadt  
(1955) S. 540
- 41) Teylow, J.I., Hirsch, A., Veterinary Record  
und Mattick, A.E.R.: 61 (1949): 197
- 42) Whitehead, E.P.: Biochem.J. 27  
(1933): 1793
- 43) Whitehead, E.P., und New Zealand J  
Riddet, W.: Agricult. 46  
(1953): 295

44) Wilson, G.S., und Miles,  
A.A.:

Topley and Wilsons  
Principles of Bac-  
teriology and Im-  
munity 2  
(1949): 144

45) Winkle, S.:

Mikrobiol. u. sero-  
log. Diagnostik, G.  
Fischer Verlag,  
Stuttg., (1955)  
S. 120 und 173

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Klieve für die Überlassung des Themas sowie für die Zuweisung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut meinen Dank aussprechen.

Herrn Dr. Sven Carlson danke ich für die Hilfe, die er mir bei der Durchführung und Besprechung der Versuche zuteil werden ließ.

### Lebenslauf

Ich wurde am 23. November 1931 in Berlin-Dahlem geboren. Mein Vater ist Regierungsgewerberat, meine Mutter versorgt den Haushalt. Wir waren 4 Geschwister.

In Duisburg besuchte ich von 1938 an die Volksschule und kam 1942 auf die Oberschule. Nach einem totalen Bombenschaden und mehreren Evakuierungen zogen wir 1943 nach Wittenberg und siedelten 1947 nach Bitterfeld über. An der dortigen Oberschule bestand ich 1950 die Reifeprüfung. Zunächst arbeitete ich als Krankenpflegepraktikant. Zum WS 1950/51 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität Mainz und bestand Ende des WS 1952/53 das Physikum. Nach einem einsemestrigen Studium in Bonn kehrte ich an die Mainzer Universität zurück und beendete am 15. November 1956 das medizinische Universitätsstudium mit dem Staatsexamen.





